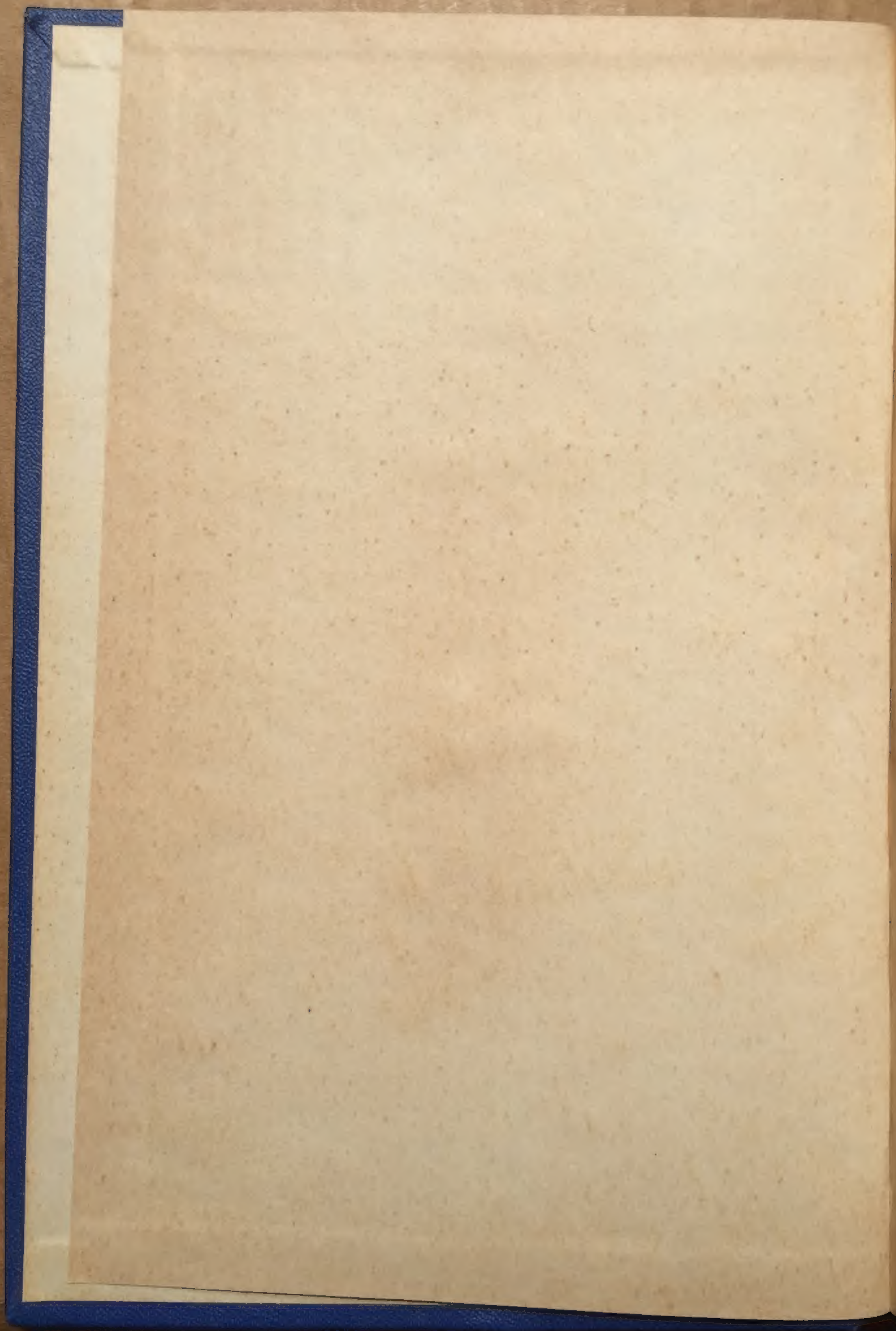


И. М. ТЕРЕШИН

**ПРЕОДОЛЕНИЕ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ**

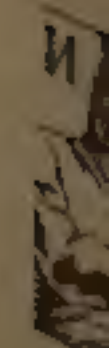
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ





И. М.

ЛЕ
УС



И. М. ТЕРЕШИН

**ПРЕОДОЛЕНИЕ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ**

**ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**



ЛЕНИНГРАД · «МЕДИЦИНА»

Ленинградское отделение

1977

Преодоление лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний. Тврешин И. М. Л., «Медицина», 1977, 184 с.

Монография посвящена одной из центральных проблем современной химиотерапии — резистентности микроорганизмов (бактерий и грибов) к антибиотикам и ее преодолению. В ней приведены современные данные о механизмах устойчивости к антибиотикам, применяемым в клинической практике, прослежены условия, способствующие ее возникновению и распространению. Особое внимание уделено результатам многочисленных исследований, в том числе автора, направленных на изыскание путей предупреждения и подавления резистентности бактерий к противомикробным препаратам, с использованием для этой цели ряда лекарственных и других биологически активных веществ, действующих на интимные механизмы жизнедеятельности бактериальной клетки. В монографии освещены методы, используемые в повседневной клинической практике для лечения заболеваний, вызванных устойчивой микрофлорой.

Книга рассчитана на микробиологов, биохимиков, врачей и других специалистов, интересующихся данной проблемой. Содержит 29 таблиц, 2 рисунка. Библиография — 467 названий.

Т $\frac{51002-065}{039(01)-77}$ 191-77

© Издательство «Медицина»,
Москва, 1977 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
<i>Глава I. Современные представления об эпидемиологии и механизмах лекарственной устойчивости микроорганизмов</i>	<i>7</i>
Изменение белоксинтезирующего аппарата клетки и синтеза нуклеиновых кислот	19
Изменение клеточной стенки и цитоплазматических мембран	21
<i>Глава II. Применение ДНК-тропных соединений для преодоления устойчивости к антибиотикам</i>	<i>39</i>
<i>Глава III. Межбактериальная передача резистентности к антибиотикам и ее подавление</i>	<i>61</i>
Передача устойчивости к антибиотикам при генетической трансформации и действие некоторых препаратов на этот процесс	61
Передача устойчивости к антибиотикам при конъюгации и действие некоторых препаратов на этот процесс	82
Передача устойчивости к антибиотикам при трансдукции и действие некоторых препаратов на этот процесс	95
<i>Глава IV. Поиск путей преодоления лекарственной устойчивости на основе представления о ее механизмах</i>	<i>103</i>
Применение мембранотропных и поверхностно-активных веществ для преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам	103
Повышение чувствительности к антибиотикам белоксинтезирующей системы бактерий как один из возможных путей преодоления устойчивости	112
Подавление ферментов, инактивирующих антибиотики, — один из путей преодоления резистентности бактерий к антибиотикам	115
<i>Глава V. Предупреждение и преодоление резистентности бактерий к антибиотикам в клинической практике</i>	<i>124</i>
Литература	161

ИБ №

ИГОРЬ

Редакт
Худож
Переп
Техни
Корре

Сдан
Печ.
Цена

Ленин

Ленин
вста
Ленин

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость микроорганизмов к лекарственным веществам является большим злом для медицинской практики и представляет значительный теоретический интерес для изучения генетики изменчивости бактерий.

В результате широкого применения антибиотических препаратов патогенные микроорганизмы могут достигать такой высокой степени устойчивости к применяемым антибиотикам, что дальнейшее использование этих препаратов с лечебной целью становится бессмысленным.

Первые данные о лекарственной устойчивости бактерий были получены М. Г. Косяковым, который в 1887 году наблюдал, как возбудитель сибирской язвы при многократных пересевах в средах с возрастающими концентрациями буры приобретал способность развиваться в присутствии таких количеств препарата (0,004%), которые обычно подавляли его рост.

В последующие годы было опубликовано большое количество работ, посвященных изучению устойчивости патогенных и непатогенных микроорганизмов к различным химическим, физическим, биологическим и другим факторам. Большинство этих исследований имели сугубо специальное значение и осуществлялись чаще всего с целью демонстрации изменчивости микробов.

С введением в лечебную практику новых специфических препаратов — сульфаниламидов и антибиотиков — проблема лекарственной устойчивости приобрела более широкое значение и стала серьезным препятствием для эффективного применения этих ценных терапевтических средств.

В обширных монографиях и обзорах Шнитцер и Грюнберг (1960), М. Н. Лебедева и С. Д. Воропаева (1960), Mitsuhashi (1971), Ю. О. Сазыкин (1972), Lowbury, Ayliffe (1974), Hahn (1976) и другие на основании обобщения большого количества данных мировой литературы и собственных исследований показали, что неотработанность лечебных доз, непродуманность схем лечения, увлечение каким-либо одним антибиотиком, необоснованные сочетания или нерациональные замены препаратов, недостаточное изучение чувствительности бактерий к лекарственным веществам и т. д. приводят к резкому снижению эффективности ряда антибиотиков при отдельных заболеваниях в силу развития резистентности.

Быстрое нарастание количества устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий определило важнейшие задачи исследователей: изучение причин появления резистентных вариантов, выяснение факторов, способствующих их распространению, и, самое главное, поиск путей преодоления лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний. Первое, на что обратили внимание исследователи, была изменчивость, в некоторых случаях значительная, которой подвергалась чувствительная клетка, превращаясь в антибиотикоустойчивую. В связи с этим наметилось одно из направлений изучения причин возникновения резистентности — сравнительный биохимический и микробиологический анализ устойчивых и чувствительных к антибиотикам бактерий. В результате было обнаружено, что устойчивые микробы могут отличаться от чувствительных по морфологии, антигенным, ферментативным и другим свойствам, способности образовывать капсулы, окрашиваться по Граму, аминокислотному составу, количеству нуклеиновых кислот и ряду других особенностей. Эти данные послужили основанием для предположений, что такая широкая изменчивость не может происходить без существенных изменений в генетическом аппарате бактериальной клетки.

Открытия 60-х годов показали, что основным «веществом наследственности» является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), в последовательности нуклеотидов которой зашифрована вся генетическая информация, необходимая для жизнедеятельности клетки. О ведущей роли ДНК в процессах, обеспечивающих резистентность микробной клетки к антибиотикам, свидетельствовали данные о генетической трансформации некоторых видов микроорганизмов, чувствительные клетки которых превращались в устойчивые при контакте с ДНК, выделенной из антибиотикорезистентных бактерий.

В качестве одной из главных задач изучения проблемы резистентности к антибиотикам рассматривается установление причин появления и распространения антибиотикоустойчивых форм бактерий. До недавнего времени решающим условием для развития резистентности считали контакт чувствительной клетки с антибиотиком. При этом не исключалась возможность «спонтанного» приобретения устойчивости под влиянием того или иного мутагена или без него. Такой подход к изучаемому вопросу предусматривал появление одной клетки или целой микробной популяции, устойчивой к антибиотикам, при участии последнего (адаптация) или в его отсутствие (мутация) с последующим отбором (в присутствии антибиотика) антибиотикоустойчивых форм.

Это направление исследований позволило получить большое количество интересных сведений: были даны закономерности фенотипической изменчивости устойчивости микроорганизмов к антибиотикам *in vitro*, обнаружен синтез ферментов, разру-

шающих антибиотики, исследована возможность возникновения устойчивых к антибиотикам бактерий под влиянием факторов неантибиотического характера (5-бромурацил, кофеин, ультрафиолет и др.); изучена динамика возрастания степени устойчивости к различным антибиотикам, на основании чего были даны обоснования наиболее эффективных сочетаний антибиотиков и т. д.

Однако с каждым годом все с большей ясностью обнаруживалась ограниченность такого подхода к объяснению причин распространения устойчивости к антибиотикам. Было показано, что при решении этой проблемы необходимо учитывать взаимодействие отдельных бактерий в микробной популяции. Клетка, приобретающая устойчивость, не должна рассматриваться изолированно от других членов биоценоза, сложившегося под влиянием условий среды и межвидовых и внутривидовых взаимоотношений бактерий; в связи с этим при изучении процесса развития устойчивости недостаточно ограничиваться исследованиями особенностей метаболизма резистентной клетки, свойств препарата, к которому возникает резистентность, и условий их взаимодействия. Кроме того, было установлено, что для распространения устойчивых бактерий присутствие во внешней среде антибиотика, как фактора отбора, далеко не всегда является необходимым и что распространение устойчивых форм может быть не только внутривидовым процессом, но и связанным с микроорганизмами другого вида. Все это составило основу для предположения, что к существенным причинам появления и распространения резистентных бактерий относятся процессы активной или пассивной передачи ДНК от устойчивых к антибиотикам клеток чувствительным. К таким процессам относятся конъюгация, трансдукция и трансформация бактерий (Watanabe, 1963; И. М. Терешин, 1965, и др.).

Обобщение и анализ литературных данных о трансдукции, трансформации и конъюгации привели к выводу об актуальности и перспективности исследований, направленных на выяснение значения названных генетических процессов для появления и распространения антибиотикоустойчивых форм бактерий в медицинской практике. Такое направление научных работ определило новый подход к изучению причин увеличения количества антибиотикоустойчивых штаммов, при котором учитывается: а) возможность межбактериальной передачи резистентности; в том числе от непатогенных видов микроорганизмов к патогенным, например от *E. coli* к *Sh. flexneri*; б) распространение устойчивых форм в отсутствие антибиотика; в) значение плазмид и трансдуцирующих фагов для возникновения бактерий, устойчивых к ряду антибиотиков; г) генетическая трансформация как исходное звено для последующего отбора резистентных клеток при участии антибиотика. Перечисленные факторы служат основой для выдвижения новых задач в области изыскания

средств, подавляющих резистентность бактерий или предотвращающих их появление. Это прежде всего обнаружение таких препаратов, которые бы в значительной степени подавляли или угнетали полностью передачу антибиотикоустойчивости при трансдукции, трансформации или конъюгации и в то же время были безвредными в применяемых концентрациях для организма человека или животных. Особые усилия необходимо направить на разработку средств угнетения трансдукционных и конъюгационных механизмов межклеточного переноса генетических детерминант резистентности.

Прогресс в области молекулярной биологии и молекулярной генетики определил новые направления поиска средств для преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов. На основе выяснения некоторых механизмов взаимодействия антибиотиков с субклеточными надмолекулярными структурами были предприняты попытки сенсibilизировать с помощью ряда биологически активных веществ бактериальные рибосомы и ДНК к подавляющему действию антибиотических препаратов.

Значительное количество работ посвящено использованию ДНК-тропных соединений для элиминации плазмидной резистентности, а также в качестве антимуtagens. Осуществляется широкий поиск препаратов, способных повышать проницаемость клеточных мембран резистентных микроорганизмов для антибиотиков. Большое внимание уделяется изысканию путей подавления ферментов, инактивирующих антибиотики.

Наряду с перечисленными способами повышения эффективности антибиотиков сохраняет свое значение рациональный подбор синергидных сочетаний антибиотических препаратов. Важнейшими средствами подавления антибиотикоустойчивых штаммов являются новые антибиотики, выделенные из продуцентов или полученные методом химической модификации молекул уже известных антибиотиков.

Нельзя не отметить развернувшиеся в последнее время (в ряде стран на уровне государственной системы) комплексные исследования, результаты которых могут явиться серьезной основой для разработки современной стратегии и тактики химиотерапии инфекций, вызванных возбудителями, устойчивыми к антибиотикам. Основным содержанием таких рекомендаций могут быть создание комплекса мероприятий, предусматривающих строгий контроль за использованием антибиотиков в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, а также для профилактики заболеваний.

Поскольку проблема в целом переживает поисковый период, это обстоятельство делает целесообразным проведение анализа современного состояния раздела науки об антибиотиках, связанного с поиском путей преодоления резистентности патогенных микробов к лекарственным веществам.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МЕХАНИЗМАХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Вскоре после введения в медицинскую практику таких высокоэффективных химиотерапевтических препаратов, как сульфаниламиды и антибиотики, в литературе были опубликованы сообщения о появлении устойчивых к сульфаниламидам (Maclean et al., 1939), пенициллину (Abraham et al., 1941) и стрептомицину (Murray et al., 1954) штаммов патогенных микроорганизмов.

Характеризуя современную ситуацию (Otaа, 1974; Hoffman, 1974, и др.), можно констатировать, что в настоящее время стафилококки, выделенные от больных, устойчивы к пенициллину в 70—90% наблюдений, к стрептомицину, тетрациклину, левомецетину более чем в 50%, к антибиотикам-макролидам — в 30%. Среди бактерий группы кишечной палочки около половины штаммов устойчивы к тетрациклину, левомецетину, стрептомицину. Этот перечень мог бы быть продолжен применительно почти к каждому виду бактерий (С. М. Навашин, 1975).

Замечено, что количество резистентных клеток в первоначально чувствительной популяции бактерий нарастает с исключительно высокой скоростью, которая объясняется (Mitsuhashi et al., 1971) следующими факторами: а) коротким периодом генерации микробов; б) огромным количеством клеток в бактериальной популяции; в) межбактериальным переносом генов резистентности; г) инфицированностью бактерий эпизотическими факторами; д) широким использованием антибиотических веществ, создающих селективный фон для резистентных мутантов.

Изучение биохимических механизмов устойчивости к антибиотикам показало, что формирование резистентности бактерий в опытах *in vitro* отличается по своей биохимической и генетической основе от процесса повышения устойчивости клинических штаммов патогенных микроорганизмов. Например, устойчивые к пенициллину штаммы стафилококков, полученные в условиях лаборатории, в ряде случаев не обладают β -лактамазной активностью, в то время как наличие названного фермента служит основным фактором пенициллинрезистентности кокков, изолированных в клиниках. Или другой факт: при повторных пересевах представителей рода *Staphylococcus* в присутствии хлорамфеникола бактерии становятся устойчивыми к этому антибиотику, но в отличие от штаммов, выделенных из кишечника больного, они

не способны инактивировать хлорамфеникол путем ацетилирования. Mitsuhashi (1971) в качестве причин различий между антибиотикоустойчивыми штаммами лабораторного происхождения и выделенными в клинике рассматривает следующие два момента: а) наличие нескольких биохимических механизмов резистентности к одному антибиотику, проявляющихся в зависимости от условий существования микробной клетки, и б) широкое распространение среди клинических штаммов *R*-факторов, характеризующихся определенным набором генетических детерминант, которые, контролируя специфический механизм резистентности, могут становиться трансферабельными и способны использовать для своего распространения не только конъюгацию, но и трансдукцию.

Лекарственная устойчивость может быть конститутивной и индуцированной (Hashimoto et al., 1968; Inoue et al., 1969). Для первого типа резистентности характерны высокая стабильность и наследственная закрепленность независимо от наличия в среде антибиотика. Индуцированную устойчивость можно продемонстрировать чаще в результате пересевов штамма с субингибиторными концентрациями антибиотического вещества.

Следует отметить, что в литературе описано довольно много штаммов стафилококков с индуцированной резистентностью к антибиотикам (Mitsuhashi, 1971). Особенно большое количество работ посвящено индукции устойчивости к макролидным антибиотикам (Weaber et al., 1964), из которых наиболее эффективным индуцирующим агентом является эритромицин, менее активен в этом отношении олеандомицин.

В лаборатории Mitsuhashi были выделены мутанты стафилококков, характеризующиеся как конститутивным, так и индуцированным типом резистентности к линкомицину, олеандомицину и эритромицину (Kurashige et al., 1972). Статистические обобщения приводят к заключению, что преобладающим типом устойчивости стафилококков к перечисленным антибиотикам следует считать конститутивный. В связи с этим Mitsuhashi была предложена гипотеза о генетической взаимосвязи индуцированной и конститутивной резистентности. По его представлениям (Mitsuhashi, 1971), введение в клинику эритромицина первоначально привело к появлению индуцированных эритромицинорезистентных вариантов, которые в дальнейшем вследствие широкого использования других макролидных антибиотиков — олеандомицина, джосамицина — послужили генетической основой для отбора устойчивых к макролидам мутантов конститутивного типа, распространенных, как правило, в условиях клиник (Weisblum et al., 1971). Согласно результатам генетических и биохимических исследований повышенная устойчивость к антибиотикам-макролидам после индукции объясняется изменением рибосом, что снижает эффективность связывания последних с антибиотиками. Существенная роль принадлежит также мута-

ционному изменению репрессорного белка, приобретающему в результате мутации сродство к молекуле антибиотика. Kurashige et al. (1972) показали возможность индукции резистентности к эритромицину у *S. aureus* в опытах на белых мышах: уже через 2 ч после инъекции антибиотика из органов животных высеивались эритромициноустойчивые стафилококки. Однако было достаточно двух дней, чтобы (при отсутствии введения антибиотика) популяция стафилококков вновь стала чувствительной к эритромицину.

Индукцированная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам давно привлекает внимание исследователей (Hinshelwood, 1946). Различные авторы называют ее по-разному: «фенотипическая модификация устойчивости» (И. А. Захаров и др., 1967), «адаптация к антибиотику» (Севаг, Курси, 1970) и т. д., но все единодушны в том, что определяющим свойством этого типа резистентности бактерий к антибиотикам является сравнительно быстрое снижение уровня устойчивости в условиях, исключающих присутствие антибиотика. В этом состоит главное отличие названного типа резистентности от конститутивного типа устойчивости бактериальных клеток к антибиотическим препаратам.

Как показывает анализ данных литературы (Копо et al., 1969), индуцированную устойчивость к антибиотикам наблюдали главным образом среди патогенных штаммов *S. aureus*.

Сообщается, что накопление меченого эритромицина стафилококками резко уменьшается после предварительного воздействия антибиотика на микробные клетки (Weaber et al., 1964). Процесс индукции устойчивости к макролидам или тетрациклину в значительной степени угнетался в присутствии таких ингибиторов, как хлорамфеникол, актиномицин D, а при культивировании гистидинзависимых штаммов — и в условиях недостатка гистидина (Weaber et al., 1964). Эти данные указывают на существенную роль синтеза белка и нуклеиновых кислот в клеточной перестройке, связанной с индукцией резистентности. Исследователи отмечают большое разнообразие биохимических механизмов индуцированной устойчивости в зависимости от антибиотика-индуктора: например, пенициллин и его производные индуцируют образование β -лактамазы, хлорамфеникол и его производные — хлорамфениколацетилтрансферазы, тетрациклин и его производные — понижение проницаемости клеточной оболочки, эритромицин, олеандомицин и производные эритромицина — снижение эффективности образования комплекса антибиотик — рибосома (Гейл и др., 1975).

Как конститутивная, так и индуцированная устойчивость имеют генетическую основу (Demerec, Hartman, 1959). Это было доказано с помощью метода реплик (Lederberg et al., 1952) и флюктуационного анализа (Luria et al., 1943), которые подтвердили предположение, что лекарственноустойчивые мутанты

появляются спонтанно до применения химиотерапевтического агента и что роль последнего заключается прежде всего в отборе резистентных микробных клеток.

Наряду с этим в литературе опубликованы данные (Křstner, 1967), из которых следует, что антибиотические вещества в некоторых случаях могут сами быть мутагенами.

Исследования последнего десятилетия убедительно показали, что трансмиссивным плазмидным генетическим структурам — *R*-факторам — принадлежит наиболее существенная роль в распространении среди патогенных микроорганизмов резистентности к тетрациклину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламидам, ампициллину и канамицину (Mitsunashi, 1969). Важными свойствами *R*-факторов являются их передача при клеточном контакте и автономная репликация (Watanabe, 1963). Эти особенности *R*-факторов проявляются не только *in vitro*, но и *in vivo*, что дает основание сделать вывод о их значении для эволюции бактерий (Mitsunashi, 1971).

Впервые возможность межбактериальной передачи резистентности к лекарственным веществам была показана в 1959 году, когда две группы японских ученых (Akiba et al., 1960) независимо друг от друга наблюдали перенос множественной устойчивости к антибиотикам и сульфаниламидам в смешанной культуре *E. coli* и *Shigella* (Akiba, 1960). Использование метода Davis, который в 1950 году доказал значение клеточного контакта (конъюгации) для передачи другого плазмидного фактора, дало возможность Akiba et al. и Mitsunashi et al. заключить, что аналогичное явление имеет место и при *R*-переносе. Инкубация смеси небольшого числа бактериальных клеток — носителей трансмиссивного *R*-фактора с большим количеством антибиотикочувствительных реципиентов приводила к быстрому приобретению большинством реципиентных клеток резистентности к антибиотику, что послужило одним из доказательств более быстрой репликации *R*-факторов по сравнению с бактериальной хромосомой донорских клеток (Watanabe, 1963). Первые исследования (Mitsunashi, 1963) распространности переноса *R*-факторов обнаружили наличие этого процесса среди всех видов семейства *Enterobacteriaceae*, *Past. pestis* и отдельных видов семейства *Vibrio*. В дальнейшем круг микроорганизмов — обладателей *R*-факторов, значительно расширился.

В настоящее время исследователи располагают данными о возможности переноса устойчивости к большинству антибиотиков и сульфаниламидных препаратов, применяемых в медицине.

Сразу после открытия межклеточного переноса резистентности внимание ученых и клиницистов привлекли вопросы эпидемиологии *R*-факторов. В частности, в Японии в результате усилий 33 крупнейших микробиологических лабораторий в 1965—1966 годах была проанализирована устойчивость к ан-

инбиотикам 8168 резистентных штаммов *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*. Более чем 70% *R*-факторов были четырехвалентными (носители устойчивости к четырем лекарственным веществам — Tc^1 , CM, SM и SA), 14,5% — трехвалентными (CM, SM, SA), 7,1% — двухвалентными и 7,4% — одновалентными.

Опубликовано много сообщений о распространении *R*-факторов в различных странах мира. Интересно, что *R*-факторы были найдены среди штаммов микроорганизмов, выделенных в таких местах, где применение антибиотических препаратов было полностью исключено (Watanabe, 1971). Это обстоятельство служит возможным доказательством точки зрения Richmond (1973), что происхождение *R*-факторов не связано с широким применением антибактериальных веществ, а является отражением сложных генетических изменений в микробных популяциях в процессе эволюции.

Значение антибиотиков как селективных веществ, определяющих отбор штаммов — носителей *R*-факторов, было еще раз подтверждено при анализе резистентности микробных культур, выделенных от животных (Walton, 1971; Jukes, 1971), длительное время получавших антибиотики (как стимуляторы роста или лечебные препараты).

В обзорах Mitsuhashi (1971), Watanabe et al., (1972), Smith (1971), Jarolmen (1971) и др. приводятся сведения о высокой устойчивости к антибиотикам и носительстве *R*-факторов среди штаммов как патогенных (*Salmonella*), так и непатогенных для человека микроорганизмов, изолированных от крупного рогатого скота, домашней птицы, свиней и других сельскохозяйственных животных, а также от ценных пород рыб в рыбоводствах. Это делает вероятным возможность передачи *R*-плазмид от представителей кишечной микрофлоры животных, птиц и рыб возбудителям заболеваний человека.

Остановившись на эпидемиологических аспектах устойчивости к антибиотикам, необходимо выделить ряд обстоятельств, значение которых для получения определенного представления о закономерностях распространения *R*-факторов, чрезвычайно велико:

1. Наличие природного резервуара бактериальных штаммов — носителей *R*-факторов, который составляют сельскохозяйственные и дикие животные, птицы и рыбы с микрофлорой, инфицированной *R*-факторами (Mitsuhashi et al., 1967a), и здоровые люди, в кишечнике которых обитают микроорганизмы, несущие *R*-факторы, а также микробы сточных вод.

2. Возможность межбактериальной передачи *R*-факторов от непатогенных микробных видов, чаще всего кишечной палочки,

¹ Tc — тетрациклин, CM — хлорамфеникол, SM — стрептомицин, SA — сульфаниламиды.

патогенным, таким как *Shigella*, *Proteus*, *Ervinia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Providencia* и др. (Watanabe, 1963).

3. Зависимость некоторых свойств (вирулентность, контагиозность и др.) бактериальных штаммов, обладающих *R*-факторами, от характера патологического материала (моча, хирургические материалы, кал и т. д.), возраста больного, условий его жизни и ряда других эпидемиологических факторов.

4. Широкое использование вычислительной техники для учета происхождения и эпидемиологического значения *R*-факторов.

Результаты изучения эпидемиологии *R*-факторов привели к выводу о серьезной опасности дальнейшего распространения этого типа плазмид среди патогенных микроорганизмов и необходимости изыскания путей подавления передачи *R*-факторов и их элиминации из инфицированных микробных клеток. Фундаментом для рационального подхода к постановке исследований в указанном направлении могли быть данные о генетических, физиологических и молекулярно-биологических свойствах *R*-факторов. В связи с этим учеными разных стран был предпринят ряд разработок, направленных на всестороннее изучение *R*-факторов и процесса их передачи.

В аспекте генетического анализа передающейся устойчивости были изучены детерминанты, обуславливающие резистентность микробов к лекарственным веществам, ее стабильность, автономную репликацию *R*-факторов, способность к переносу в период конъюгации, особенности взаимодействия с другими генетическими элементами (*F*, *Col*, другие *R*-факторы, хромосомные структуры, фаги).

Как отмечает Mitsuhashi (1971), гены, регулирующие количественный уровень резистентности, пока не обнаружены в генетической структуре *R*-фактора. Это обстоятельство делает возможным предположение, что устойчивость резистентного штамма к тем или иным антибиотикам является следствием экспрессии определенных структурных генов *R*-фактора. Продукты активности некоторых таких генов, как показали биохимические исследования, представляют собой СМ-ацетилтрансфераза, СМ-аденилирующий фермент, КМ-фосфорилирующий (КМ-канамицин) или ацетилирующий ферменты (Shaw, 1967; Umezawa et al., 1967а, в). Установлено, что КМ-ацетилирующий фермент обеспечивает КМ-устойчивость не более чем к 100 мкг/мл антибиотика, а фермент, фосфорилирующий канамицин,— к 400 мкг/мл. С другой стороны, существует от одного до трех генов *R*-фактора резистентности к хлорамфениколу, уровень которой зависит от того, сколько из этих генов интегрировано в хромосому клетки хозяина.

Биохимический анализ β -лактамазы, продуцируемой штаммами, содержащими *R*-факторы, показал, что имеется по крайней мере два типа названного фермента, различающиеся между

собой изоэлектрической точкой, оптимумом pH и температурой специфической активности. Не исключено, что наблюдаемые различия определяются наличием двух структурных генов, детерминирующих синтез двух разных β -лактамаз.

Как известно, несколько типов лекарственной устойчивости штаммов микроорганизмов, носителей *R*-факторов, различающихся по фенотипу, передаются при конъюгации реципиентным клеткам или элиминируются акрифлавином как одна изолированная сцепленная структура. Это означает, что гены резистентности к антибиотикам расположены на одном геноме *R*-фактора (Mitsuhashi, 1971).

Способность к межбактериальному переносу является одним из наиболее важных свойств *R*-фактора. Ряд авторов, наблюдавших, что перенос *R*-факторов происходит независимо от полярности *R*-фактора и что клетки донора необратимо теряют детерминанты резистентности, пришли к заключению о существенных различиях между открытой Жакобом и Волманом эписомой *F* и *R*-факторами. Хорошо известно, что некоторые *R*-факторы подавляют активность *F*-эписом при одновременном их присутствии в цитоплазме клетки (Watanabe et al., 1964). Это свойство послужило основой для разделения *R*-факторов на две группы: подавляющие *F*-факторы (*fi*⁺) и неподавляющие (*fi*⁻)¹.

Заслуживающим внимания явлением представляется взаимодействие *R*-факторов с другими бактериальными эписомами. Так, в процессе конъюгации донорские клетки, несущие *R*-факторы и *Col*-факторы, могут передавать реципиентам оба эписомных элемента, причем в некоторых случаях перенос *Col*-факторов происходит посредством *R*-факторов (Fredericq et al., 1971). В качестве примера взаимодействия эписом можно рассматривать генетическую рекомбинацию между *RTF*-фактором (*T*-фактор) и *r*-детерминантами, которые могут самостоятельно существовать в бактериальных клетках, и только в результате конъюгации, когда они оказываются в одной клетке, происходит их объединение в *R*-фактор.

В последнее время многие исследователи (Richmond, 1973) предпринимали попытки биохимического и генетического анализа *T* (transfer)-фактора. Путем сравнения ДНК из бактериальных клеток, способных к передаче *R*-факторов, и вариантов этих клеток, лишенных *T*-фактора, была найдена (Rownd et al., 1971) молекулярная масса последнего — 50×10^6 . Richmond (1973) наделяет *T*-фактор довольно широким набором функций, среди которых: инициация и регуляция репликации плазмидной ДНК, поддержание плазмиды в клетке и сегрегация ее в дочернюю клетку при делении, генетический контроль син-

¹ Характеристику общепринятых в генетике обозначений см. Браун В. «Генетика бактерий», М., 1968.

теза веществ, необходимых для конъюгации, перенос ДНК во время конъюгации.

Электронномикроскопическое изучение микробных клеток, обладающих *R*-факторами, показало наличие на клеточной оболочке специфических микроструктур — пилусов (Datta et al., 1966), играющих важную роль в осуществлении конъюгации бактерий. Около 50% штаммов носителей *R*-факторов, характеризуются наличием *R*-пилусов, сходных по своим характеристикам с *F*-пилусами, остальные *R*-факторы детерминируют образование пилусов, подобных пилусам *Col*-штаммов (Meunell et al., 1969).

В результате генетического анализа (Mitsunashi, 1971) были получены доказательства того, что способность к конъюгации, взаимоотношения с *F*-факторами, формирование пилусов контролируются отдельными генами с локализацией на *R*-факторе.

R-факторы способны к автономной репликации в клетке хозяина, что доказывается следующими фактами: а) повышением числа R^+ -клеток в смешанной культуре, содержащей небольшое количество R^+ -доноров (Watanabe, 1963); б) подавлением межбактериальной передачи *R*-факторов ингибиторами ДНК-полимеразы (Mitsunashi et al., 1966); в) необратимой элиминацией *R*-фактора.

Кроме того, было найдено, что *R*-факторов в клетках *Proteus* более десяти, а в клетках *E. coli* — не более одного. Экспериментальные данные Rownd могут служить основанием для предположения о том, что количество *R*-факторов в бактериальной клетке детерминируется генами (или геном), входящим в состав хромосомы клетки-хозяина (Mitsunashi, 1971).

В литературе описано несколько гипотетических моделей репликации плазмид (Watanabe, 1963; Anderson, 1968). Применительно к плазмидным *R*-факторам наиболее реальной представляется схема Novick (1969), которая дает возможность объяснить стадию фрагментации (образование более мелких фрагментов плазмиды в результате репликации). Согласно этой модели репликация завершается образованием другой эписомы (плазмиды) родительского типа или образованием двух новых циклических структур: состоящих из молекул ДНК с (Г+Ц) — 48% и (Г+Ц) — 56%. Необходимо подчеркнуть, что знание механизмов репликации плазмидной ДНК, взаимодействия ее с мембраной бактериальной клетки, представление о биохимических путях образования специфических мембранных локусов фиксации плазмид крайне необходимо для изыскания новых подходов к созданию химиотерапевтических веществ, действующих на резистентные к антибиотикам микроорганизмы.

С этой точки зрения большого внимания заслуживают данные Nagada et al. (1967) о взаимном ограничении некоторых типов *R*-факторов, что связывается с возможной конкуренцией эписом за «локусы прикрепления» на цитоплазматической мем-

бране. Не исключено, что в будущем удастся найти такие препараты, которые можно было бы использовать для инактивации «локусов прикрепления» R -факторов.

Точная роль R -фактора и продуктов его функции в обеспечении переноса ДНК в процессе конъюгации представляется довольно неясной. Наиболее интересные данные, касающиеся этого вопроса, получены в опытах с использованием R^+ -«мини-клеток»¹ *E. coli* в качестве доноров (реципиентами при конъюгации служили чувствительные к антибиотику бактерии *E. coli*). Было установлено (Levy, 1971), что R^+ -«мини-клетки» могут конъюгировать с R -реципиентами и что частота переноса R -факторов в этом случае не отличается от скрещиваний, в которых принимают участие обычные R^+ -доноры. Следует отметить способность R^+ -мини-клеток многократно, при последовательных конъюгациях передавать R -факторы реципиентным клеткам, что позволяет предполагать наличие всей необходимой для переноса детерминант резистентности генетической информации в самих R -факторах: R^+ -«мини-клетки» были полностью лишены хромосомных генов (Levy, 1971).

В обзоре Richmond (1973) обобщаются современные воззрения на межбактериальный перенос R -факторов как на исключительно сложный, многостадийный генетический процесс:

1. Образование пилусов на клеточной стенке бактерий, несущих R -фактор, что означает приобретение бактериальными клетками способности к переносу плазмид.

2. Сближение донорской клетки (с пилусами) с соответствующим реципиентом и формирование между бактериями пилусного мостика, который может быть в несколько раз длиннее, чем участвующие в конъюгации микробные клетки.

3. После определенного сигнала, который, по всей вероятности, имеет место в результате «наведения» между донором и реципиентом мостика, одна цепочка ДНК R -фактора донорской клетки с помощью мостика при наличии эффективного контакта с реципиентом переходит в последний.

4. Попад в реципиент, одноцепочечная ДНК, вероятно, взаимодействует со специфическим локусом на реципиентной мембране и после этого немедленно начинается синтез комплементарной цепочки ДНК.

5. Образовавшаяся линейная двухцепочечная ДНК, по-видимому, оставаясь в прикрепленном к мембране состоянии, превращается в кольцевую форму путем ковалентного «замыкания» одной из цепочек.

6. Репликативная форма плазмиды остается в прикрепленном состоянии до следующего клеточного деления или начинает самокопирование, в результате которого образуется ее дубликат,

¹ Мини-клетки представляют собой бактериальные мутанты, в цитоплазме которых отсутствует ДНК.

освобождающийся в цитоплазму в виде ковалентно связанной циклической молекулы ДНК.

7. В двухцепочечной форме *r*-детерминанты могут транскрибироваться и транслироваться, что приводит к фенотипической экспрессии генов устойчивости к антибиотикам, локализованным на *R*-факторе.

8. Гены *R*-фактора, детерминирующие образование пилусов, также начинают фенотипически проявляться, вследствие чего реципиентная клетка становится потенциальным донором.

9. Перед клеточным делением мембранный локус вместе с расположенным на нем *R*-фактором дублируется, и каждая из двух копий *R*-фактора прикрепляется к мембранным локусам дочерних клеток, при этом копии плазмид сегрегируются.

10. Цитоплазматические копии *R*-факторов разделяются между дочерними клетками, по всей вероятности случайным образом.

11. После определенного периода, продолжительность которого зависит от генетических особенностей плазмиды, начинает репрессироваться синтез пилусов.

Исследования, направленные на выяснение генотипической (генной) структуры *R*-факторов, привели к результатам, свидетельствующим о наличии еще ряда генов, с деятельностью которых связаны важные функции *R*⁺-клеток. Среди них следует упомянуть ген (*irs*-ген), контролирующий возможность суперинфекции клетки другим *R*-фактором, и ген (*stb*-ген), осуществляющий контроль за стабильностью *R*-фактора в клетке. Использование методов рекомбинационного анализа, изучение сегрегации различных *R*-факторов, применение трансдукции позволило получить представление об относительной локализации различных генов *R*-фактора и составить карту циркулярной генетической структуры *R*-фактора.

Что касается расположения *R*-факторов в клетке, то наибольшее количество опубликованных работ посвящено выяснению взаимосвязи *R*-фактора с хромосомой хозяина. Первое сообщение (Watanabe, Fukusawa, 1961) о возможности нахождения *R*-фактора в интегрированном с хромосомой состоянии или в автономном появилось в 1961 году, в дальнейшем, благодаря широкому использованию трансдуцирующих фагов, было найдено, что *R*-факторы весьма эффективно интегрируются с бактериальной хромосомой. Nagada et al., (1967a, b), Ginoza, Painter (1964) на основании детального анализа множества мутантов и рекомбинантов *R*-факторов пришли к выводу, что *Sm*^R- и *Stm*^R-гены на хромосоме мутантов *E. coli* В и К-12 происходят от генома *R*-фактора. Pearce и Meynell (1968) продемонстрировали ряд данных, анализ которых позволяет предположить временную интеграцию *R*-фактора (ТС) в хромосому *E. coli* К-12. С каждым годом все больше исследователей обращается к изучению проблем, связанных с выяснением роли физиологии

ческого состояния донорских и реципиентных клеток в процессе конъюгационного переноса *R*-факторов. В главе III будет дано освещение современных представлений и методических подходов в этой области изучения передачи факторов резистентности. В этой главе мы ограничимся только общим описанием важнейших результатов исследований, опубликованных по названной проблеме.

Как было показано (Mitsubishi, 1971), наиболее эффективно межбактериальный перенос *R*-фактора происходит в период ранней стационарной фазы размножения клеток донора, перенос значительно подавляется в анаэробных условиях, оптимальная температура для передачи *R*-факторов от донорских клеток реципиентным находится в пределах 37—42° С, наиболее подходящий рН — 7,3—7,5.

Существенное влияние на результативность конъюгации оказывает соотношение донорских и реципиентных клеток в смешанной бактериальной культуре.

Применение ингибиторного анализа (Akiba et al., 1961; Egawa et al., 1961) дало возможность получить представление о значении гликолиза (Egawa et al., 1961), синтеза нуклеиновых кислот (Mitsubishi et al., 1966), образования различных ферментов (Egawa et al., 1961), состояния мембранных структур (Watanabe, 1963), клеточной стенки (Adelberg et al., 1965), белоксинтезирующего аппарата донорских и реципиентных клеток (И. М. Терешин и др., 1965) для оптимального прохождения межбактериального процесса передачи *R*-факторов.

Rownd et al. (1966) сообщают, что при центрифугировании в градиенте плотности CsCl ДНК, выделенной из клеток *P. mirabilis*, носителей *R*-фактора, последний обнаруживается в виде сателлитной ДНК с плотностью 1,718 г/см³, что соответствует ГЦ-типу состава оснований (58%). Было найдено, что соотношение ДНК *R*-фактора и хромосомной ДНК определяется фазой роста клеток хозяина: на всем протяжении экспоненциальной фазы процентное содержание *R*-ДНК остается постоянным, в начале стационарной фазы отношение ДНК *R*-фактора к ДНК хромосомы начинает возрастать, что сопровождается увеличением числа *R*-факторов на одну хромосому клетки хозяина в 3—4 раза (Rownd et al., 1969).

В отличие от *P. mirabilis*, как отмечается в ряде работ (Rownd et al., 1966), в резистентных штаммах *E. coli* и *Serratia marcescens* на одну хромосому хозяина приходится один *R*-фактор. Предполагается, что в бактериальных клетках названных видов имеет место более «жесткий» контроль за репликацией плазмид, чем в клетках *P. mirabilis*. В результате дальнейших исследований, проведенных рядом авторов (Nagada et al., 1963) с использованием методов трансдукции и аналитического ультрацентрифугирования, получены данные, из которых был сделан вывод (Mitsubishi, 1971), что *R*-фактор

состоит из двух молекулярных структур: фактора переноса (или *RTF*) и собственно фактора резистентности (*r*-детерминанты), который включает в себя не только гены устойчивости к лекарственным веществам, но и гены, контролирующие автономную репликацию и стабильность в клетке *R*-фактора. Предполагается, что фактор переноса и *r*-детерминанты не всегда находятся в одной бактериальной клетке и что формирование *R*-фактора и его перенос возможны только в случае рекомбинации между ними, эффективность которой зависит от физиологического состояния микробной клетки.

Рассматривая различия фенотипов хромосомной и плазмидной резистентности к антибиотикам, необходимо указать на возможность одновременного присутствия в клетке генов устойчивости, расположенных на хромосоме, и *R*-факторов (Meunell et al., 1968). Обычно такое «сосуществование» носит синергидный характер, что делает микробную клетку весьма устойчивой к действию антибиотических веществ (Ginoza, Painter, 1964). Обнаружено несколько вариантов изменения резистентности к антибиотикам при совмещении в одной бактериальной клетке внехромосомных и хромосомных детерминантов устойчивости (С. А. Лебедева и др., 1973):

1. В присутствии *R*-фактора выявлено неадекватное повышение резистентности к канамицину, тетрациклину, хлорамфениколу у мутантов, устойчивых к перечисленным веществам.

2. Высокореzистентные к стрептомицину хромосомные мутанты после передачи им *R*-факторов сохранили уровень резистентности к антибиотику, определяемый хромосомными генами; «суммарная» устойчивость слабореzистентных клеток превышала ожидаемую теоретически.

3. Резистентность пенициллино- и мономициноустойчивых мутантов, получивших соответствующие внехромосомные детерминанты резистентности, проявлялась только в той степени, которую обычно обеспечивали гены изученных факторов множественной лекарственной устойчивости. Проявление хромосомных генов резистентности к пенициллину и мономицину было полностью замаскировано активностью детерминантов *R*-фактора.

Необходимым условием для результативного изыскания новых антибиотических веществ, подавляющих жизнедеятельность лекарственноустойчивых микроорганизмов, является выяснение важнейших биохимических механизмов, обеспечивающих резистентность клетки к используемым в медицинской практике антибиотикам.

Как отмечалось выше, механизмы резистентности к антибиотикам можно разделить на две основные группы: 1) устойчивость клетки связана с мутационным изменением определенной субклеточной структуры (рибосомы, мембраны и др.), которая в чувствительной клетке представляет собой главную мишень действия антибиотика. Это изменение препятствует губитель-

ному воздействию антибиотического вещества на бактериальную клетку и способствует превращению последней в антибиотикоустойчивую. Такой механизм резистентности распространен прежде всего среди мутантов, полученных в лабораторных условиях, хотя описаны факты, показывающие, что он имеет значение и в условиях клиники. 2) Плазмидная устойчивость клетки, проявляющаяся в химической модификации и последующей инактивации антибиотика или же в снижении проницаемости мембран. Многочисленные исследования различных авторов (Richmond, 1973) убедительно показали, что именно второму механизму принадлежит ведущее место среди причин появления и распространения антибиотикоустойчивых микроорганизмов в клиниках, детских учреждениях и т. д.

В связи с этим представляется целесообразным остановиться в общих чертах на молекулярно-биологических особенностях мутантов, изолированных в лабораториях, и дать более подробное описание биохимических механизмов резистентности штаммов, выделенных из природных источников (как отмечалось выше, подавляющее количество таких штаммов являются носителями R-факторов). Естественно, что здесь будут затронуты механизмы резистентности лишь к тем антибиотикам, которые широко применяются в медицинской практике.

Что касается лабораторных мутантов, то механизмы их резистентности к антибиотикам можно разделить на два типа.

ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕГО АППАРАТА КЛЕТКИ И СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Большой прогресс в изучении этого типа резистентности был обусловлен широким использованием таких антибиотиков, как хлорамфеникол, пуромидин, тетрациклин и др. в качестве специфических ингибиторов синтеза белка. Исключительно детальный обзор на эту тему представлен в монографии Ю. О. Сазыкина (1972). В основу большинства исследований механизмов резистентности, связанных с изменением белоксинтезирующего аппарата бактерий, легла способность рибосомных субъединиц аппарата к самосборке в полноценные рибосомы (Nomura et al., 1970). Использование этого подхода позволило установить, что изменение малой субъединицы (30S) ответственно за резистентность рибосом к аминогликозидным антибиотикам — стрептомицину, спектиномицину, канамицину.

Изменения в большой субъединице (50S) могут вызывать резистентность рибосом к антибиотикам-макролидам, в частности, к эритромицину и к спиромицину. Измененные субъединицы теряют способность связывать антибиотик. Так, 30S-субъединицы рибосом из резистентного к стрептомицину штамма *E. coli* не связывали дигидрострептомицин в условиях, в которых наблюдалось эквимоллярное связывание антибиотика с

30S-субчастицами чувствительного штамма (Kaji, Tanaka, 1968). На ряде мутантов *E. coli* была показана прямая корреляция между степенью резистентности и снижением константы связывания антибиотика. У резистентного к эритромицину штамма *Bac. subtilis* константа связывания 50S-субчастиц рибосом с антибиотиком оказалась почти на 2 порядка ниже, чем у чувствительного штамма, 50S-субъединицы рибосом мутантов *S. aureus* с конститутивной или индуцированной резистентностью к спирамицину связывали антибиотик значительно слабее, чем субъединицы рибосом чувствительного штамма (Shimizu et al., 1971).

В связи с интенсивным развитием методов препаративного разделения рибосомальных белков и успехами в сборке активных субъединиц рибосом из отдельных компонентов удалось установить, какие белки ответственны за возникновение резистентности к тем или иным антибиотикам. Так, показано, что резистентность к стрептомицину у мутанта *E. coli* Q₁₃ возникает вследствие изменений P₁₀ белка малой субъединицы.

Канамицин и неомицин очень сходны со стрептомицином по характеру действия на синтез белка и на рибосомы. Как и последний, они не только тормозят синтез белка, но и вызывают ошибки в трансляции (Tanaka et al., 1967), защищают рибосомы от температурной денатурации (Shalom, Brock, 1967) и стабилизируют ассоциацию рибосомальных субчастиц (Е. Б. Лишневская и др., 1971). Во взаимодействии канамицина (а возможно, и неомицина) с рибосомой принимает участие тот же белок P₁₀, который ответствен за взаимодействие со стрептомицином. Однако канамицин и неомицин вызывали ошибки считывания в бесклеточной системе с рибосомами не только из чувствительного, но и из резистентного к стрептомицину штамма, тогда как стрептомицин в последнем случае был неэффективен. В отличие от стрептомицина неомицин защищает от температурной денатурации 70S-рибосомы не только чувствительного, но и резистентного к стрептомицину штамма *E. coli* (Shalom, Brock, 1967). При всем сходстве резистентности к стрептомицину, канамицину и неомицину, даже если эти изменения происходят в одном и том же белке, они не идентичны.

До сих пор речь преимущественно шла об антибиотиках, резистентность к которым связана с изменением 30S-субъединицы рибосомы; гораздо меньше данных о молекулярных механизмах действия на рибосомальном уровне хлорамфеникола и эритромицина, оказывающих влияние на 50S-субъединицу.

Долгое время не удавалось найти мутантов, резистентных к хлорамфениколу с рибосомной локализацией изменений. Однако в 1973 году группа японских исследователей обнаружила несколько таких мутантов *Bac. subtilis* (Osawa et al., 1973). Рибосомальные белки мутантов разделили на карбоксиметилцеллюлозе. У разных мутантов изменения были найдены в раз-

ных белках, причем изменение в некоторых белках сопровождалось снижением (по сравнению с диким штаммом) связывания рибосомами как хлорамфеникола, так и эритромицина. Несколько ранее теми же авторами было показано, что у некоторых резистентных к эритромицину мутантов *E. coli* значительно снижена способность связывать хлорамфеникол. В связи с этим было высказано предположение о тесном взаимоотношении мест связывания обоих антибиотиков на рибосоме. Это предположение хорошо согласуется с данными других авторов о слабом торможении хлорамфениколом пуромидиновой реакции в системе с рибосомами из эритромицинорезистентного штамма *E. coli* (Černa, Ryčlik, 1968).

Среди антибиотиков, которые известны как специфические ингибиторы синтеза рибонуклеиновой кислоты, практическое значение имеют, пожалуй, только рифамицин и его производные, подавляющие процесс транскрипции в бактериальной клетке, взаимодействуя с ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Были получены мутанты, резистентные к рифамицинам. Оказалось, что для мутантных клеток характерна РНК-полимераза с измененной β -субъединицей (как известно, РНК-полимераза из *E. coli* содержит пять субъединиц: α_1 , α_2 , β , β_1 , V), играющей существенную роль в обеспечении каталитических функций энзима. Нарушение фермента приводит к блокированию инициации синтеза.

Большинство противомикробных препаратов ДНК-тропного действия применяется в качестве противоопухолевых средств (митомицин С, актиномицины, блеомицин и др.). К наиболее известным антибактериальным веществам, специфически подавляющим синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты, относится налидиксовая кислота (Goss et al., 1965). Мутанты, резистентные к налидиксовой кислоте, были выделены Hane и Wood (1969), но биохимический механизм резистентности пока остается неизвестным. На генетической карте *E. coli* картированы два гена устойчивости *nal A* (к 5 мкг/мл) и *nal B* (более высокий уровень резистентности; Helling et al., 1971).

Сравнительно недавно получены экспериментальные данные, указывающие на ДНК-тропность эритромицина и тетрациклина (Л. С. Кравченко, 1970; А. Я. Ровинская, 1973). Эти результаты приведены и подвергнуты детальному анализу в главе III.

ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В ряду антибиотиков, механизм действия которых непосредственно связан с влиянием на мембранные структуры, находятся пенициллин, цефалоспорины, грамицидин С, полимиксин, бацитрацин, ваиномицин, полиеновые противогрибковые антибиотики и некоторые другие.

Общая последовательность событий при воздействии пенициллина на клетку по Strominger (1971) представляется следующей: а) инактивация мембранных ферментов: транспептидазы и аланинкарбоксипептидазы, катализирующих терминацию синтеза муреина; б) угнетение синтеза «завершенного» муреина клеточной стенки с накоплением его предшественников, не обладающих достаточной механической прочностью; в) повышение чувствительности плазматической мембраны к внутриклеточному осмотическому давлению; г) дезорганизация структуры и функции плазматической мембраны под влиянием осмотического шока; д) выход из клетки жизненно важных метаболитов и нарушение процессов активного транспорта; е) гибель клетки, сопровождающаяся развитием аутолитических процессов. Подобная точка зрения приведена в монографии Гейла и др. (1975), которые указывают, что подавление синтеза пентаглициновых мостиков (сшивок) лишает пептидогликан прочности.

Особый интерес исследователей в последние годы вызывает взаимодействие пенициллинов и цефалоспоринов с мембраносвязанными ферментами.

В работе Reinolds (1974) показана чувствительность мембраносвязанной карбоксипептидазы и транспептидазы к β -лактамным антибиотикам. Blumberg (1974), используя афинную хроматографию, сумел продемонстрировать непосредственное связывание пенициллина с 5 различными мембранными белками *Bac. subtilis*, которое может быть причиной конформационных изменений в мембранной структуре. Вместе с тем пока остается неясным, связывается ли пенициллин с субстратным локусом транспептидазы или с ее аллостерическим центром. Возможно, для ферментов различных фракций клеток или ферментов разных микроорганизмов существуют свои закономерности.

Например, установлено, что между транспептидазой из *S. aureus* и пенициллином формируется ковалентная связь, в то время как фермент из *Streptomyces* связывает пенициллин нековалентно, и антибиотик может быть удален из комплекса с помощью β -лактамазы. Представляют интерес данные о механизме действия нового представителя цефамицинов — цефокситина, резистентного к β -лактамазе. Этот антибиотик подавляет синтез пептидогликана, и место его связывания оказалось аналогичным таковому цефалоридина, цефалотина и пенициллина в случае грамположительных бактерий. Однако в опытах с грамотрицательными бактериями конкуренции цефокситина с названными антибиотиками за место связывания не наблюдалось, что является неожиданным и требующим дальнейшего изучения фактом.

Показано, что циклический полипептидный антибиотик бацитрацин подавляет критическую стадию в биосинтезе клеточ-

ной стенки: энзиматическое дефосфорилирование C_{55} изопренил-пирофосфата.

Своеобразным механизмом мембранотропного действия характеризуются такие антибиотики, как грамицидин С и полимиксин. Newton (1974) показано, что избирательное связывание флюоресцирующих аналогов полимиксина осуществляется в плазматических мембранах. Основную роль при этом играет образование комплексов антибиотика с мембранными фосфолипидами и главным образом с фосфатидилэтаноламином. Фейнгольдом предложена молекулярная модель (Feingold et al., 1974) взаимодействия этого фосфолипида с полимиксином В.

К наиболее типичным представителям веществ мембранотропного действия относятся полиеновые антибиотики (амфотерицин В, леворин, нистатин, кандицидин, кандидин и др.). Эти антибиотики представляют интерес в связи с их широким применением при кандидозах, дерматомикозах, висцеральных микозах и других грибковых инфекциях.

В настоящее время резистентность к этим препаратам не составляет серьезных препятствий для эффективной химиотерапии. Тем не менее «горький опыт», накопленный при использовании антибиотиков для борьбы с бактериальными инфекциями, диктует целесообразность начала изучения механизмов устойчивости и изыскания возможностей ее преодоления на самых первых этапах применения антибиотических препаратов в медицинской практике.

В связи с этим рядом исследователей были предприняты разработки, направленные на выяснение механизмов действия полиеновых антибиотиков.

Вскоре после открытия первого антифунгального антибиотика тетраена-нистатина, или фунгицидина, возник интерес к проблеме резистентности микрогрибов к противогрибковым препаратам. Этот интерес стимулировался данными о возможной связи механизма действия полиенов с различными липидными компонентами клетки грибов, в частности со стеринами. После нескольких неудачных попыток были получены резистентные к нистатину и нистатину с амфотерицином формы *Candida albicans*. Весь последующий этап изучения полиеновых препаратов подтвердил возможность появления устойчивых штаммов при медикаментозных способах лечения разных грибковых инфекций.

Проблеме химического строения полиенов, основам их биологической активности, механизмам действия, а также некоторым аспектам резистентности к ним было посвящено несколько крупных обзоров (Кинский, 1969; Hamilton-Miller, 1973, 1974). Наиболее общие, с точки зрения механизма действия, свойства полиеновых антибиотиков заключаются в том, что они действуют только на клетки высших и низших эукариот, являясь специфическими мембранотропными агентами и наиболее

вероятной «мишенью» для их действия в мембране служат стерольные компоненты.

Рядом исследователей были получены данные о широкой вариабельности в толерантности к полиенам среди представителей разных родов микрогрибов. Установлено, что устойчивость к амфотерицину возникала скорее и была более высокой по уровню (до 400 раз), чем к нистатину, у *Candida parapsilosis*, *Torulopsis glabrata* и некоторых других видов грибов (Bodenhoff, 1969; Bourdu, 1969). Некоторые авторы обращали внимание на значительное варьирование в минимальных ингибирующих дозах не только среди представителей разных видов и родов, но и среди отдельных штаммов одного вида.

Упомянутые случаи касались микрогрибов, изучаемых вне зависимости от химиотерапии. Однако к настоящему времени накопились данные о выделении в клинике резистентных штаммов. Были обнаружены устойчивые к амфотерицину штаммы *Cryptococcus*, в дальнейшем были изолированы и *in vitro* устойчивые формы у этого объекта (Kim et al., 1974), *Candida albicans* (Pekowski et al., 1972), *Candida tropicalis* и некоторых других видов.

Многие исследователи отмечают корреляцию повышения уровня устойчивости со снижением патогенности изучаемых резистентных грибных штаммов (Hamilton-Miller, 1972) — ситуация, хорошо известная для резистентных штаммов бактерий.

Впервые работы по детальному изучению генетических основ устойчивости к полиенам были проведены Woods с соавт. Были получены после индукции этилметансульфонатом резистентные к нистатину штаммы *S. cerevisiae*. Генетический анализ факторов резистентности позволил выделить (по локализации мутационных изменений) мутанты «ядерные» и «цитоплазматические». Описаны формы, зависящие от нистатина. В определении резистентного фенотипа, по данным авторов, принимало участие 5 ядерных генов, три гена-модификатора (невыявленной локализации) и несколько цитоплазматических детерминантов устойчивости, причем во всех случаях чувствительность доминировала над резистентностью (Ahmed, 1972).

Обобщая приведенные данные, можно сделать вывод, что в основе устойчивости микроорганизмов к полиеновым антибиотикам лежат, как правило, полигенные изменения; мутации, приводящие к устойчивому фенотипу, обычно рецессивны, а в случаях доминантности — доминируют более низкие уровни резистентности над высокими. По локализации резистентность бывает ядерная и цитоплазматическая, а резистентный фенотип микроба — по сути дела количественный признак (особенно полирезистентный фенотип).

Что касается биохимических аспектов полиенустойчивости, то наибольшее число данных в настоящее время свидетельствует в пользу стерольной гипотезы. Не исключены и иные механизмы

устойчивости к полиеновым препаратам (ферментативная деградация антибиотиков и первичные изменения мембранных компонентов, отличных от стеролов-фосфолипидов, белков, жирных кислот).

Вместе с тем несомненно, что любые мутации к полиенрезистентности у микрогрибов, а также механизмы действия этих препаратов, так или иначе затрагивают структурные и функциональные особенности мембран.

В литературе имеются данные о количественном или качественном изменении состава стерина в клетках дрожжей и дрожжеподобных грибов, которые приобрели устойчивость к полиенам как под действием мутагенов, так и в процессе адаптации (Fryberg et al., 1974). Однако наряду с этим описаны резистентные культуры, не отличающиеся по стерinovым компонентам от чувствительных клеток (Hamilton-Miller, 1972).

Можно думать, что устойчивость этих штаммов есть не что иное, как следствие переориентации или маскировки специфических стеринных «сайтов» на мембране, что делает их менее доступными для полиеновых антибиотиков. Поскольку структура и свойства мембран находятся в тесной зависимости от их состава, резистентность к полиенам в данном случае может определяться количественными или качественными изменениями таких мембранных компонентов, как жирные кислоты, фосфолипиды и белки. В последнее время представляется возможным наметить ряд новых подходов в изучении механизма действия мембранотропных антибиотиков, к которым, в первую очередь, относятся полиеновые препараты. На основе сегодняшних знаний можно предположить, что взаимодействие полиеновых антибиотиков с мембраной приводит к изменению конформации локального или достаточно протяженного района мембраны. Известно, что эти изменения обуславливают нарушение избирательной проницаемости и транспортных свойств, но одновременно они могут вызывать и значительную дезорганизацию протекающих на мембране процессов. Сюда относится синтез белка мембраносвязанными рибосомами, репликация, многочисленные ферментативные реакции. До сих пор эта сторона проблемы ускользала от внимания исследователей, а между тем такая постановка вопроса позволит не только конкретизировать характер повреждений, вызываемых в клетке полиеновыми антибиотиками, но и поможет глубже понять регуляторную роль мембраны, многообразные функции которой могут служить своего рода чувствительными тестами, характеризующими состояние отдельных ее участков.

Другим подходом к изучению механизма действия полиеновых антибиотиков является исследование комплекса изменений, происходящих в клетке при возникновении резистентности. В последнее время появляются интересные работы в этом направлении, но в них основное внимание обращено на стеринные ком-

поенты мембраны у мутантов с разным уровнем и характером устойчивости к полиенам.

С учетом современных данных о многообразии и взаимозависимости мембранных компонентов можно предположить, что мутации, приводящие к резистентности, могут затрагивать также синтез ряда других соединений, в частности фосфолипидов и жирных кислот.

Проведенные автором с сотрудниками исследования показали, что изменения мембранных структур, которые, по-видимому, имеют место при образовании полиен-стериновых комплексов, существенно отражаются на функционировании ряда связанных с мембраной ферментов — лактатдегидрогеназы, нитрофенилфосфатазы, АТФ-азы, ингибируя их активность. Обнаружение эффекта полиенов как *in vitro*, так и *in vivo*, отсутствие действия антибиотиков на ферменты растворимой фракции и очищенные ферментные препараты, значительно более слабое ингибирование полиенами ферментативной активности мембран из клеток полиенрезистентных штаммов — все эти данные свидетельствуют об опосредованности действия полиеновых антибиотиков мембранными структурами.

Получен также экспериментальный материал, из которого следует, что взаимодействие полиеновых антибиотиков с мембранами, по-видимому, не затрагивает мембранных «сайтов», связывающих рибосомы. Обнаружено, что синтез белка в мембранной фракции ингибируется полиенами слабее, чем в цитозоле, что, возможно, связано с меньшей чувствительностью мембраносвязанных рибосом к дефициту калия в клетке в результате действия антибиотиков. Возможно, дефицит калия является также причиной резкого снижения белоксинтезирующей активности рибосом из клеток, обработанных полиенами, в бесклеточной системе из *Candida albicans*.

У выделенных в лаборатории устойчивых мутантов *Candida albicans* возникновение полиенрезистентности сопровождается исчезновением из клеток эргостерола и заменой его другими стерольными компонентами. Это не сказывалось на способности культуры адсорбировать антибиотики, но, по-видимому, препятствует образованию специфического комплекса полиенов со стеринами.

Показано, что полиеновые антибиотики вызывают изменения состава липидов и белков мембран. Интерес исследователей к изучению микробных липидов вызван не только липидотропностью некоторых антибиотических веществ. С каждым годом появляется все больше работ, из которых следует, что липидам клеточной оболочки микроорганизмов принадлежит определенная роль в обеспечении резистентности клетки к ряду антибиотиков. Anderes et al., (1971) был исследован липидный состав клеток *P. aeruginosa*, чувствительных и устойчивых к хлорамфениколу. Обнаружено, что устойчивые клетки, способные расти

в присутствии 2
больше общего
торы считают,
в клетке является
чивости *P. aeruginosa*.
В виоминир
далась аккумуля
мина и фосфат
обнаружено свя
точные оболочки
липидов на 30%
штаммы станов
фатидилэтанола
Культивиров
S. aureus, Str.
способствует увели
растанию рези
пенициллину, и
туральную сре
уменьшением л
ние чувствител
У ряда мик
отличающихся
циклину, пени
липидов разли
устойчивости.
низмов обнар
кислот и цикл
ными штамма
свойствами к
риальных кул
вых культур
пидов. Исклю
пенициллину гр
зависимости
жирных кисл
в резистентн
количество с
хлороформа
обычно обна
ток. О связ
ством липид
многие авто
шинство ис
ности микр
склонны сч
жей и др
изменения

в присутствии 2,5 мг/мл хлорамфеникола, содержат на 28% больше общего количества липидов, чем чувствительные. Авторы считают, что увеличение степени биосинтеза липидов в клетке является фактором, играющим важную роль в устойчивости *P. aeruginosa* к хлорамфениколу.

В виомицинрезистентном штамме *Rhizobium meliloti* наблюдалась аккумуляция в клеточной стенке фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, микроэлектрофоретически было обнаружено связывание виомицина поверхностью клетки. Клеточные оболочки резистентных штаммов содержали фосфатидиллипидов на 30% больше, чем чувствительные клетки. Устойчивые штаммы становились чувствительными, когда количество фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина было уменьшено.

Культивирование грамположительных бактерий *Bac. subtilis*, *S. aureus*, *Str. faecalis* в присутствии глицерина, который способствует увеличению синтеза липидов клетки, привело к возрастанию резистентности микробов к пенициллинам: бензилпенициллину, клоксациллину, метициллину. Введение в культуральную среду панкреатической липазы, сопровождавшееся уменьшением липидов в клеточной оболочке, вызывало повышение чувствительности штаммов к взятым в опыт антибиотикам.

У ряда микроорганизмов (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *S. aureus*), отличающихся между собой по степени резистентности к тетрациклину, пенициллину и полимиксину, наблюдаются в составе липидов различия, которые коррелируют с уровнем антибиотикоустойчивости. У всех грамотрицательных устойчивых микроорганизмов обнаружено повышенное содержание ненасыщенных кислот и циклопропановых кислот по сравнению с чувствительными штаммами. Данные изменения оказались наследственными свойствами клеток, а не результатом роста и старения бактериальных культур. У всех изученных чувствительных и устойчивых культур не выявлено качественных различий в составе липидов. Исключением явились устойчивые и чувствительные к пенициллину грамположительные кокки, у которых не установлено зависимости между количественными изменениями в составе жирных кислот и их резистентностью к антибиотикам. Однако в резистентных к пенициллину кокках содержалось большее количество общих липидов (экстрагируемых из клеток смесью хлороформа с метанолом) и дифосфатидилглицеридов, которые обычно обнаруживают в мембранных фракциях микробных клеток. О связи между устойчивостью к антибиотикам и количеством липидов в клеточной оболочке бактерий приводят данные многие авторы. Как уже отмечалось, в настоящее время большинство исследователей, занимающихся вопросами резистентности микроорганизмов к антибиотикам полиеновой структуры, склонны считать основной причиной устойчивости клеток дрожжей и дрожжеподобных грибов к этой группе антибиотиков изменения в составе стеринного компонента липидов мутантных

штаммов (Fryberg et al., 1974; Hamilton-Miller, 1972). Предполагается, что стерины, обнаруженные в клетках устойчивых культур, обладают более низким сродством к полиеновым антибиотикам, чем эргостерин — основной стеринный компонент дрожжей и дрожжеподобных грибов дикого типа (Fryberg et al., 1974). Однако в литературе не имеется данных о прямых экспериментах, подтверждающих это предположение. В то же время выяснение этого вопроса необходимо для целенаправленных поисков путей преодоления полиенрезистентности. Это явилось основанием для проведения ряда исследований, результаты которых приведены ниже (А. М. Вирина и др., 1975).

Был получен резистентный штамм *Candida albicans*, в клетках которого эргостерин полностью отсутствовал и был заменен новым стеринным компонентом, и прослежено, как влияет подобное изменение состава стеринов на взаимодействие полиеновых антибиотиков с целыми клетками и непосредственно со стеринными компонентами клеток резистентного и чувствительного штаммов.

Изучение стеринного состава клеток *Candida albicans* показало, что в клетках чувствительного штамма преобладающим компонентом является эргостерин, тогда как у резистентного штамма эргостерина не обнаружено и вместо него присутствуют другие стерины с максимумом поглощения в области 215—240 нм.

Возникло предположение, что изменение стеринного состава может препятствовать связыванию полиеновых антибиотиков с мутантными клетками. В связи с этим было проведено определение уровня связывания амфотерицина Б с клетками чувствительного и резистентного штаммов *Candida albicans*. Оказалось, что способность резистентных клеток связывать антибиотик не ниже, чем у чувствительных культур. Способность стеринов, выделенных из клеток резистентного и чувствительного штаммов, взаимодействовать с полиеновыми антибиотиками установили, оценивая защитный эффект, который они оказывают на рост *Candida albicans* в присутствии исследуемых антибиотиков. Полученные результаты показали, что стеринные компоненты клеток как чувствительного, так и резистентного штаммов защищают *Candida albicans* от действия полиеновых антибиотиков. Наиболее значительный эффект наблюдали при добавлении в среду инкубации амфотерицина Б. Минимальная подавляющая концентрация этого антибиотика в присутствии стеринов была в 10—20 раз выше, чем в контроле. Защитный эффект при добавлении в культуру нистатина был незначителен, что говорит о слабом взаимодействии его со стеринами.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что стерины, выделенные из устойчивого штамма, способны так же эффективно связываться с полиеновыми антибиотиками в растворе, как и стерины исходного чувствительного штамма.

Дальнейшей задачей было выяснение способности стеринам резистентного и чувствительного штаммов образовывать специфические комплексы с полиеновыми антибиотиками, приводящие к изменению избирательной проницаемости клетки. Было обнаружено, что антибиотики эффективнее индуцируют выход калия из клеток дикого типа, чем из клеток резистентной культуры. Для того, чтобы выяснить, связано ли это явление с различием в стеринном составе исследуемых штаммов или обусловлено другими факторами, была использована модельная бислойная мембрана, в состав которой включали стерин, выделенные из чувствительной и резистентной к полиенам культур. Исследование зависимости проводимости мембран, полученных из азалекина и содержащих стерин из чувствительного штамма, от количества амфотерицина Б показало, что проводимость растет пропорционально его концентрации. Эффективность действия антибиотика на исследуемые мембраны начинала проявляться уже при концентрации 10^{-7} М и достигала максимума при $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Бислойные мембраны, включающие стерин из устойчивых клеток, не содержащих эргостерин, практически не изменяли проводимости при этих концентрациях антибиотика, что указывает на прямую связь стеринного состава клеток с фенотипическим проявлением резистентности к полиенам.

Полученные нами данные дают основание утверждать, что стерин резистентного штамма в составе клеток и в растворе сохраняют способность связываться с полиенами на том же уровне, что и стерин чувствительного штамма, однако у них снижена способность образовывать специфические комплексы с антибиотиками, изменяющие мембранную проницаемость для ряда веществ.

Сходное явление наблюдали при изучении взаимодействия филипина с холестерином в мембранах *Acholeplasma laidlani*.

Гейл и др. (1975) предполагают, что полиеновые антибиотики сначала связываются с клеткой неспецифически, а затем происходит их фиксирование на специфических «сайтах» и образование комплексов с компонентами мембраны. По-видимому, изменение стеринного компонента у резистентного штамма *Candida albicans* не отражается на первом этапе связывания амфотерицина Б с клеткой, но лимитирует осуществление второго этапа взаимодействия.

Краткий обзор биохимических механизмов резистентности, генетический контроль которой осуществляется на хромосомном уровне, позволяет сделать заключение о больших достижениях в области выявления интимных молекулярно-биологических изменений субклеточных структур, приводящих в конечном итоге к превращению чувствительной к антибиотику бактериальной клетки в устойчивую. Особенно детально изучены изменения белоксинтезирующего аппарата и клеточной оболочки.

микроорганизмов. В связи с этим уже сегодня представляется реальным направленный поиск таких веществ, которые могли бы стать ингибиторами фенотипического проявления новых признаков (пониженная проницаемость оболочки для антибиотиков, уменьшение связывания антибиотика с рибосомами и т. д.) устойчивой к антибиотику микробной клетки.

Биохимические механизмы устойчивости, определяемой наличием в микроорганизмах *R*-фактора, начали активно изучать только в последние 10 лет. Наибольший прогресс был достигнут благодаря работам, посвященным анализу свойств ферментов, инактивирующих антибиотики, в том числе и такие, которые сравнительно недавно нашли применение в медицинской практике.

Вскоре после начала клинического использования ампициллина появились сообщения о выделении резистентных к этому антибиотику штаммов *E. coli*, *Salmonella* и *Shigella*, которые характеризовались наличием *R*-фактора. Устойчивые к ампициллину штаммы необратимо инактивировали антибиотик путем ферментативного гидролиза β -лактамного кольца. Datta, Kontomichalou изучали физико-химические и биологические свойства β -лактамаз, продуцируемых *E. coli*, *Sl. typhimurium* и *Sl. paratyphi*, изолированных из природных источников. В результате проведенных исследований было обнаружено, что грам-отрицательные бактерии синтезируют конститутивные β -лактамазы, относящиеся скорее к эндоэнзимам, чем к экзоэнзимам. Свойства β -лактамаз, их субстратная специфичность различаются в зависимости от типа β -факторов (Egawa et al., 1967). Было проведено сравнительное изучение β -лактамаз, продуцируемых грамотрицательными микроорганизмами, по следующим свойствам: а) способность гидролизовать различные антибиотики (бензилпенициллин, ампициллин, цефалоридин, цефалексин и карбенициллин); б) иммунологические характеристики; в) электрофоретическая подвижность при pH 8; г) чувствительность к пара-меркурибензонату и клоксациллину (Richmond et al., 1971). На основе полученных результатов ферменты были разделены на четыре класса: 1) основные белки, активные главным образом в отношении производных цефалоспоринов, которые не подавляются пара-меркурибензонатом, чувствительны к клоксациллину, не дают перекрестных реакций с антисывороткой против R^+ - β -лактамазы; 2) кислые белки, гидролизующие преимущественно пенициллины, устойчивые к пара-меркурибензонату, ингибируемые клоксациллином, некоторые из которых слабо реагируют с антисывороткой; 3) кислые белки, гидролитически инактивирующие как пенициллины, так и цефалоспорины, резистентные к пара-меркурибензонату и чувствительные к клоксациллину, перекрестно реагирующие с сывороткой, полученной против β -лактамаз, выделенных из R^+ -штаммов *E. coli*; 4) нейтральные белки, сходные по ряду свойств с третьей груп-

пой β -лактамаз активные в пр
Кроме того
не менее, до
ция наиболее
мотрицательны
пенициллины
терминирует
1971), однако
к карбеницил
второго типа
Хотя сами
клетками β -л
ганизмам (А
этих фермен
бактериями:
aureus.

Novick (1967) у *S. aureus*, к
на плазмиде
Вас. cereu
низкими ко
нов (метиц
ские β -лак
индуцирова
Несмотря н
цированной
существует
яснения эт
Описание
руемых гр
средство к
Детальны
обнаружи
об общно
 β -лактама
пению ре
ных штам
свойств у
Однако
в клиниче
лину, по
ния (Sak
вели то
к антиби
(Benven
циллину
зоустой

пой β -лактамаз, но инактивируемые пара-меркурибензонатом и активные в присутствии клоксациллина.

Кроме того, были описаны новые типы β -лактамаз, но, тем не менее, до настоящего времени представленная классификация наиболее полно характеризует распространенные среди грамотрицательных микроорганизмов ферменты, гидролизующие пенициллины и цефалоспорины. Большинство *R*-факторов детерминирует синтез β -лактамаз третьего типа (Richmond et al., 1971), однако *R*-факторы штаммов *Pseudomonas*, резистентных к карбенициллину, обеспечивают в основном синтез β -лактамаз второго типа (Sabath et al., 1965).

Хотя самые ранние публикации о синтезе бактериальными клетками β -лактамаз посвящены грамотрицательным микроорганизмам (Abraham et al., 1940), большинство исследований этих ферментов представлено опытами с грамположительными бактериями: *Bac. cereus*, *Bac. licheniformis* и особенно со *S. aureus*.

Novick (1967b), используя трансдукцию, нашел, что гены *S. aureus*, контролирующие синтез β -лактамазы, локализованы на плазмиде. Грамположительные микробы, за исключением *Bac. cereus*, продуцируют пенициллиназы, индуцированные низкими концентрациями пенициллиназоустойчивых пенициллинов (метициллина, оксациллина). Природные и полусинтетические β -лактамные антибиотики различаются по способности индуцировать образование β -лактамаз (Imsande et al., 1972). Несмотря на обилие гипотетических моделей механизма индуцированного синтеза пенициллиназ, до настоящего времени не существует достаточно убедительного экспериментального объяснения этого явления.

Описано три иммунологических типа пенициллиназ, синтезируемых грамположительными бактериями, все они имеют слабое сродство к полусинтетическим пенициллинам и цефалоспорином. Детальный анализ аминокислотного состава этих β -лактамаз обнаружил их сходство и послужил основой для предположения об общности эволюционного происхождения всех трех типов β -лактамаз (Richmond, 1973). Четкий параллелизм между степенью резистентности и пенициллиназной активностью изученных штаммов не вызывает сомнения в связанности названных свойств устойчивых микробных клеток.

Однако имеются сведения (Kayser et al., 1972) о выделенных в клинике штаммах *S. aureus*, которые устойчивы к метициллину, но продуцируют β -лактамазу. Многочисленные исследования (Sabath et al., 1970), проведенные с этими штаммами, привели только к предположению о связи их резистентности к антибиотику с изменением проницаемости клеточной оболочки (Benveniste, Davies, 1973). Как правило, устойчивость к метициллину сопровождается устойчивостью к другим пенициллиназоустойчивым пенициллинам (оксациллину, клоксациллину).

В 1965 году Okamoto, Suzuki сообщили что штамм *E. coli* с *R*-фактором, обуславливающим устойчивость к пяти лекарственным веществам (тетрациклину, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламидам и канамицину), синтезирует ферменты, которые инактивировали хлорамфеникол, канамицин и стрептомицин. Дальнейшее изучение показало, что реакция инактивации хлорамфеникола происходит только в присутствии ацетил-СоА и что завершается она образованием 3-О-ацетилхлорамфеникола и 1,3-О-О-диацетилхлорамфеникола (Shaw, 1967; Suzuki et al., 1967).

В связи с тем, что моноацетилирование или диацетилирование хлорамфеникола нарушает структуру пропандиола, входящего в состав молекулы антибиотика, происходит потеря антибактериальной активности последнего.

Инактивирующий хлорамфеникол фермент, названный хлорамфениколацетилтрансферазой, был впервые выделен в очищенном виде из *R*⁺-штамма *E. coli* (Shaw, 1967). Было найдено, что фермент синтезируется конститутивно, является эндоферментом, имеет молекулярную массу 80 000 и состоит из четырех идентичных каталитически неактивных субъединиц, молекулярная масса каждой из которых составляет 20 000.

Как правило, хлорамфениколацетилтрансфераза не обнаруживается в чувствительных к антибиотику или в ставших резистентными в результате пересевов с хлорамфениколом *in vitro* бактериальных клетках (Mitsunashi et al., 1976).

Перечисленные факты позволяют утверждать, что устойчивость к хлорамфениколу содержащих *R*-фактор микроорганизмов обуславливается наличием фермента (Mitsunashi, 1971), однако необходимо иметь в виду и другие данные (Shaw, 1967), из которых следует, что некоторые *R*-штаммы *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, чувствительные к хлорамфениколу, характеризовались наличием определенной ацетилирующей активности. Были изолированы спонтанные мутанты клеток *P. mirabilis*, у которых высокий уровень резистентности к хлорамфениколу сопровождался заметным повышением активности ацетилтрансферазы. Сравнение этого фермента с энзимом, выделенным из *R*⁺-клеток, показал их значительное сходство: они имели близкую молекулярную массу, состояли из четырех субъединиц, проявляли активность только в отношении D-трео-стереоизомера хлорамфеникола, инактивировались антисывороткой, полученной в результате иммунизации ферментом из *R*⁺-бактерии. Большинство *R*-факторов, контролирующих синтез хлорамфениколацетилтрансферазы, относятся к *fi*⁺-типу (Hedges et al., 1971). Имеются лишь отдельные сообщения о выделении и очистке названного фермента из бактерий — носителей *fi*⁻—*R*-факторов. При этом отмечены различия в электрофоретических, иммунологических и каталитических свойствах хлорамфениколацетилтрансферазы в зависимости от типа *R*-фактора.

Выраж
кола отме
штаммами
рий, где с
конститути
руется под
ция ослож
ляется ин
ацетилтра
ниц сход
отличаетс
свойствам
Следует

николу ш
свойством
Предпола
нений в
проникнов
механизм
энзиматич
et al., 197
вазии ант
занная эн
ленно.

На се
ские меха
к аминогл
канамицин

В лите
тивной де
ацетилиро
групп и ад

Okamo
(1967a) п
А путем
антибиоти

Испол
топный м
C¹⁴-ацети

чивых к
тибиотик,
цин. Меж
численны

канамици
щие назв
ным ами
В да
изолиро

2 и. м. т

Выраженное энзиматическое ацетилирование хлорамфеникола отмечалось и в опытах с устойчивыми к этому антибиотику штаммами *S. aureus*. В отличие от грамотрицательных бактерий, где синтез хлорамфениколацетилтрансферазы происходит конститутивно, в стафилококках образование фермента индуцируется под влиянием хлорамфеникола или его аналогов. Индукция осложняется тем обстоятельством, что хлорамфеникол является ингибитором синтеза белка. Очищенная стафилококковая ацетилтрансфераза по молекулярному весу и составу субъединиц сходна с таковой, выделенной из кишечных бактерий, не отличается от нее по иммунологическим и электрофоретическим свойствам.

Следует отметить, что некоторые резистентные к хлорамфениколу штаммы *E. coli*, выделенные в клинике, не обладают свойством инактивировать хлорамфеникол (Nagai et al., 1972). Предполагается наличие у этих штаммов индуцируемых изменений в проницаемости клеточной оболочки, препятствующих проникновению в клетку антибиотика. Известны также и другие механизмы инактивации бактериями хлорамфеникола, например энзиматическое восстановление нитрогрупп антибиотика (O'Brien et al., 1971). Однако клиническое значение этой формы инактивации антибиотика представляется сомнительным, так как указанная энзиматическая реакция протекает исключительно медленно.

На сегодняшний день фундаментально изучены биохимические механизмы резистентности патогенных микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам (стрептомицин, неомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин и др.).

В литературе описано три различных механизма ферментативной деградации аминогликозидов (Benveniste et al., 1973): ацетилирование аминогрупп, фосфорилирование гидроксильных групп и аденилирование гидроксильных групп.

Okamoto и Suzuki впервые обнаружили, а Umezawa с сотр. (1967a) первые выделили фермент, инактивирующий канамицин А путем ацетилирования 6-амино-6-деоксиглюкозного остатка антибиотика.

Используя разработанный ими высокочувствительный изотопный метод, Benveniste и Davies нашли, что в присутствии C^{14} -ацетил-СоА частично очищенный экстракт из клеток, устойчивых к канамицину А, инактивировал не только названный антибиотик, но и канамицин В, неомицин, гентамицин и шизомицин. Между тем оказалось, что субстратная специфичность перечисленных антибиотиков недостаточна для их инактивации канамицин-А-ацетилтрансферазой: R^+ -штаммы *E. coli*, образующие названный фермент, оставались чувствительными к остальным аминогликозидным антибиотикам.

В дальнейшем были открыты еще две ацетилтрансферазы: изолированная из резистентных к гентамицину штаммов *P. aeruginosa*.

ginosa и *E. coli* — гентамицинацетилтрансфераза I (Brzezinska et al., 1972) и второй энзим — гентамицинацетилтрансфераза II, полученная из антибиотикоустойчивых бактерий *Providencia* (Benveniste, Davies, 1973).

Что касается аденилирования аминогликозидных антибиотиков штаммами *E. coli*, содержащими *R*-фактор, то первыми исследователями, наблюдавшими это явление (в опытах со стрептомицином), были Umezawa с сотр. (1968). В том же 1968 году Yamada et al. (1968) продемонстрировали перенос аденилового остатка (АМФ) на 3'-гидроксильную группу *N*-метил-*L*-глюкозаминового остатка стрептомицина в присутствии аденилаттрансферазы (выделена из устойчивого к стрептомицину *R*⁺-штамма *E. coli*), дивалентных катионов и АТФ.

Образование стрептомицинаденилаттрансферазы клиническими штаммами микроорганизмов было подтверждено в дальнейшем исследованиями Takasawa и соавт. (1968), им же удалось дать характеристику продуктам ферментативной инактивации стрептомицина.

Benveniste et al. (1970) в результате изучения большого количества резистентных к гентамицину штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli* пришли к заключению, что происхождение устойчивости к антибиотику связано с его инактивацией аденилаттрансферазой. При сравнении ряда свойств этого фермента со стрептомицинаденилаттрансферазой (Benveniste et al., 1971) выяснилось, что наряду со сходством (оптимум pH, зависимость от двухвалентных катионов) между указанными ферментами существуют заметные различия. В частности, они легко разделяются при хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, различаются по потребности в редуцирующих соединениях, способности к переносу рибозных и дезоксирибозных цитидинмонофосфата, тимидинмонофосфата и некоторым другим свойствам (Benveniste et al., 1973).

К третьему типу микробных ферментных реакций, в результате которых происходит инактивация аминогликозидных антибиотиков, относится фосфорилирование.

Наиболее интересными с практической точки зрения являются стрептомицинофосфотрансфераза и неомицин-канамицинфосфотрансфераза. Первый из названных энзимов находили в клетках, изолированных в клинике штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, которые были устойчивы к стрептомицину. Фермент отличается от аденилаттрансферазы тем, что никогда не обнаруживается в спектиномициноустойчивых *R*⁺-бактериальных клетках и по субстратной специфичности (Benveniste et al., 1970).

Другая фосфотрансфераза также была найдена в *R*⁺-штаммах *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* (Kondo et al., 1968), которые фосфорилировали все аминогликозиды, имеющие в своей структуре 3'-гидроксильную группу. Интересно, что ряд других

аминогликозидных
действию
Davies, 1973
Таким
в клинике
тентными
ацетилиро
щим для
они конст
поверхнос
обычно пр
отрицател
мицин- и
подчеркну
гликозиде
известно,
группы ф
зусловно
кулярных
Как
ханизма
с измене
тибиотик
Davies,
в работа
(1971).
хромосо
зистентн
системе,
генами,
именно
(мол./м
тически
Поскол
проблем
лочки
с тем
различ
клины
чивали
(Ю. О
Из
ных м
эффек
Рато
чески
у *E.*
маю

аминогликозидов, например тобрамицин, могут ингибировать действие неомидин-канамицифосфотрансферазы (Benveniste, Davies, 1973).

Таким образом, широко используемые в настоящее время в клинике аминогликозиды могут быть инактивированы резистентными штаммами при участии ферментативных реакций ацетилирования, фосфорилирования или аденилирования. Общим для этих процессов является тот факт, что катализируются они конститутивными ферментами, локализованными вблизи поверхности клетки (Benveniste, Davies, 1973). В клиниках обычно превалируют R^+ -штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий, которые продуцируют неомидин-канамицин- и стрептомицифосфорилирующие энзимы. Необходимо подчеркнуть, что очистка ферментов, инактивирующих аминогликозиды,—исключительно сложный процесс, и, насколько нам известно, до сих пор не удалось выделить представителя этой группы ферментов в гомогенной форме. Это обстоятельство безусловно затрудняет проведение сравнительного анализа молекулярных структур ферментов.

Как известно, общепризнанная концепция относительно механизма тетрациклинорезистентности связывает резистентность с изменением проницаемости оболочки микробной клетки к антибиотикам этой группы (Ю. О. Сазыкин, 1972; Benveniste, Davies, 1973). Эта теория получила блестящее подтверждение в работах с мини-клетками, проведенных главным образом Levy (1971). Имея в мини-клетке кишечной палочки, не содержащей хромосомной ДНК, R -фактор с детерминантом тетрациклинорезистентности, Levy смог в такой своеобразной полумодельной системе, где не было синтеза белков, кодируемых хромосомными генами, наблюдать появление в мембране белка, кодируемого именно r -детерминантом тетрациклинорезистентности. Белок (мол./масс порядка 55 000) не обладает, по-видимому, энзиматическими свойствами (ввиду чего его и трудно было выявить). Поскольку белок сейчас выявлен и выделен, можно ожидать, что проблема изучения механизма изменения проницаемости оболочки к тетрациклинам получит новое развитие по сравнению с тем длительным периодом, когда разные авторы показывали различными методами, что в чувствительную клетку тетрациклины проникают, а в резистентную — не проникают, и ограничивались практически констатацией лишь этого положения (Ю. О. Сазыкин и др., 1975).

Из других лекарственных веществ, резистентность патогенных микробов к которым служит серьезным препятствием для эффективной терапии, представляют интерес сульфаниламиды. Pato и соавт. (1963) сообщают, что имеется два вида бнохимических механизмов резистентности к сульфаниламидам *in vitro* у *E. coli*: а) устойчивость к сульфаниламидам энзима, принимающего участие в синтезе дигидроптеарата из ПАБК и птери-

дина, и б) понижение степени проникновения сульфаниламидов в устойчивые к ним бактериальные клетки.

Механизм сульфаниламидорезистентности R^+ -штаммов *E. coli* был довольно подробно изучен Yokota с соавт. (1962), которые отмечают, что бесклеточная система, синтезирующая фолат, угнетается в равной степени, независимо от того, из какого штамма (резистентного к сульфаниламидам или чувствительного) она получена. Из этих результатов было сделано предположение, что резистентность к сульфаниламидам определяется изменением проницаемости клеточной оболочки микроба. Эксперименты с сульфатиазолом- S^{35} подтвердили эту гипотезу: степень включения препарата в устойчивые клетки *E. coli* была в 3 раза меньше таковой у чувствительного к указанному сульфаниамиду штамма. Однако, по мнению Mitsuhashi (1971), биохимический механизм резистентности к сульфаниламидам еще далек от своего полного раскрытия. Не исключено и в данном случае участие инактивирующих ферментов.

Трудно найти более дискуссионную проблему в области изучения резистентности бактерий к антибиотикам, чем происхождение факторов резистентности. Какова роль антибиотиков в образовании новых факторов резистентности? Существует ли филогенетическая связь между вирусами, профагами и R -факторами? Насколько велика вероятность хромосомного происхождения R -факторов? В результате мутации каких генов сформировались гены, локализованные на R -факторах? Что представляют собой «предшественники» R -факторов? Каково относительное значение мутационных и рекомбинационных процессов в образовании R -факторов? Эти и многие другие вопросы ждут своего экспериментального решения, несмотря на интенсивный поиск, развернутый в этом направлении в крупнейших лабораториях мира.

Пока происхождение R -фактора находит свое объяснение в виде более или менее вероятных гипотез (Watanabe, 1963; Mitsuhashi, 1971, и др.).

Основные факты, которые используются при выдвижении той или иной гипотезы, можно представить в виде следующего перечня:

1. R -факторы выделяют из микроорганизмов почвы в таких районах земного шара (Соломоновы острова), где антибиотики никогда не применялись (Davis, Anandan, 1970).

2. Распространение R -факторов в большинстве стран происходит не в виде ступенчатого, с последовательно возрастающей интенсивностью процесса, а как эпидемия исключительно контагиозной инфекции, имеющая «взрывной характер» (Mitsuhashi, 1971).

3. R -факторы способны к автономной репликации, межбактериальному переносу и относительно стабильно связаны с бактериальной клеткой-хозяином.

4. Процесс появления и распространения *R*-факторов в различных странах происходит независимо от их географического положения.

5. Детерминанты резистентности (*r*) *R*-факторов имеют определенную гомологию с бактериальной хромосомой, с замещенным (*F'*) и незамещенным (*F*) фактором пола с P1-эпсилон- и P22-бактериофагами.

В результате интеграции с хромосомой клетки хозяина или бактериальной эписомой *R*-факторы могут терять или приобретать конкретные свойства.

6. Детерминанты резистентности (*r*) могут быть перенесены из одной бактериальной клетки в другую в результате следующих процессов:

а) интеграция в хромосому клетки-хозяина и перенос вместе с ней при участии *F*-конъюгации, *R*-конъюгации (Sugino et al. 1962), *T*-конъюгации (Nakajima et al., 1970);

б) рекомбинация с различными эписомными факторами: *F*-фактором (Watanabe et al., 1966в), *F'*-фактором (Harada et al., 1967а), *R*-фактором (Harada et al., 1967b) и *T*-фактором (Mitsunashi, 1969; Kameda et al., 1969);

в) комплементация с различными эписомными факторами: *F* (Harada et al., 1964), *T* (Kameda et al., 1969) и др. Перенос *R*-факторов во время терапевтического использования антибиотиков далеко не всегда следует рассматривать как главную причину распространения антибиотикоустойчивых форм возбудителя: довольно часто инфицирование бактерий *R*-факторами в клинических условиях происходит до применения антибиотиков в результате низкого уровня санитарного состояния окружающей среды. С другой стороны, в обзорах ряда авторов (Smith, 1971; Datta, 1971) показано, что в кишечнике здоровых людей *R*⁺-штаммов бактерий часто содержится значительно больше, чем у пациентов инфекционных клиник, а в связи с тем, что число переносов устойчивости пропорционально количеству *R*⁺-клеток (Watanabe, 1963), можно ожидать, что вне клиник вероятность передачи детерминант резистентности значительно выше.

По мнению Richmond (1973), возникновение *R*-факторов и их распространение среди домашних животных отражают обычный процесс эволюции бактерий, которые использовали лабильность своего генетического аппарата для того, чтобы противостоять «сокрушительному наступлению», предпринятому объединенными силами фармацевтической промышленности и работников здравоохранения.

Серьезному и эффективному изучению эпидемиологии и эволюции *R*-факторов препятствует отсутствие простого и точного метода обнаружения и идентификации плазмид. Только в последние годы в связи с научно-техническим прогрессом в области электронной микроскопии появился метод, позволяющий с до-

статочной надежностью находить плазмиды в бактериальных клетках и производить их идентификацию. Этот метод, в частности, широко используется в лаборатории проф. Mitsuhashi (Япония), которому удалось сделать его рутинным методическим подходом для исследования нескольких тысяч штаммов различных видов микроорганизмов, поступающих в лабораторию из многих клиник Японии.

Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам служит препятствием не только для эффективного использования химиотерапевтических препаратов, она серьезно осложняет правильную диагностику инфекционных заболеваний. Еще в первых работах (В. А. Цыганов 1964), посвященных описанию явления антибиотикоустойчивости, отмечалось, что резистентные к антибиотикам варианты микробных клеток довольно часто по ряду свойств отличаются от чувствительных бактерий. С каждым годом число сообщений, подтверждающих эту точку зрения, увеличивалось. Было показано, что чувствительные и устойчивые к антибиотикам бактерии одного и того же вида могут различаться по следующим важным для бактериологической диагностики свойствам: антигенным, морфологическим (форма колоний, величина и форма клеток, наличие капсулы), биохимическим — интенсивность метаболизма, набор ферментов (Шнитцер, Грюнберг, 1960), фагоцитарной активностью (А. М. Мужиченко и др., 1974) и ряду других признаков.

Следует остановиться на вирулентности устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Если 10—15 лет тому назад исследователи были склонны считать (Barber et al., 1953), что приобретение микробной клеткой в условиях клиники признака антибиотикоустойчивости обычно связано с повышением вирулентности, то в настоящее время признается, по крайней мере для кишечных бактерий, некоторое снижение вирулентности микробной клетки, степень устойчивости которой к антибиотикам повысилась.

Таким образом, приведенные в настоящей главе материалы свидетельствуют как о большой практической значимости проблемы резистентности, так и о тех методических трудностях, которые стоят перед исследователями в процессе ее решения. Можно без преувеличения сказать, что без ее решения может быть поставлена под сомнение перспектива антибиотикотерапии, как ведущего метода лечения инфекционной патологии. Именно поэтому очевидно, что только всестороннее обобщение существующих медико-биологических данных, каких бы аспектов они не касались, может стимулировать дальнейший эффективный поиск выхода из той сложной ситуации, в какой оказалось здравоохранение в силу устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний ко многим противомикробным веществам. Этому в значительной степени посвящены последующие главы.

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ТРОПНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

В последовательности нуклеотидов ДНК заключена генетическая информация, необходимая для жизнедеятельности бактериальной клетки — этот вывод составляет одно из самых существенных достижений биологической науки второй половины 20-го века. Развитие современных представлений о происхождении лекарственной устойчивости микроорганизмов, ее генетической детерминированности самым тесным образом связано с изучением клеточных ДНК-содержащих структур, постоянно присутствующих в клетке (хромосомы) или попадающих в нее в результате инфекции (различные плазмидные факторы). Далеко не последнее место в устремлениях исследователей, ставящих своей задачей преодоление лекарственной устойчивости, занимает поиск таких веществ, которые, непосредственно действуя на бактериальные хромосомы или автономно реплицирующиеся плазмиды, подавляли бы их функциональную активность.

Убеждение в том, что ДНК микробной клетки играет существенную, если не определяющую, роль в формировании такого эволюционно важного генетического признака бактерий, как устойчивость к лекарственным веществам, сложилось на основе большого экспериментального материала.

В 1944 году Avery et al. сообщили, что ДНК, извлеченная из капсулообразующих S-форм пневмококков, превращает некапсулообразующие пневмококки R-форм в капсулообразующие S-формы. Такую трансформацию можно было осуществить путем добавления ДНК в очень малых концентрациях в питательную среду, на которой выращивались при соответствующих условиях некапсулообразующие пневмококки. Эта работа показала, что необходимая для синтеза нового белка или полисахарида генетическая информация заключается в ДНК.

В последующие годы было опубликовано большое количество наблюдений трансформации с помощью ДНК разнообразных признаков, в том числе и резистентности к сульфаниламидным и антибиотическим препаратам (см. обзоры: Хейс, 1965; Ravin, 1961 и др.).

Подтверждением ведущей роли ДНК бактериальной клетки в процессах, связанных с приобретением устойчивости к антибиотикам, явились работы по конъюгации и трансдукции микроорганизмов. Результаты исследований Жакоба и Воллмана, Хейса и многих других убедительно продемонстрировали, что устойчивость к тому или иному антибактериальному препарату контролируется одним или несколькими генами, расположен-

ными на бактериальной хромосоме, материальную основу которой составляют молекулы ДНК.

На значение изменений молекулярной структуры ДНК в процессе превращения чувствительной к антибиотикам бактериальной клетки в устойчивую указывали данные об индуцировании антибиотикоустойчивости под влиянием ДНК-тропных мутагенных агентов, таких как 5-бромурацил и ультрафиолет. А. Г. Скавронской и др. (1968) были проведены исследования на патогенных бактериях *Sl. typhimurium* возможности получения стрептомициноустойчивых мутантов при воздействии 5-бромурацилом. Они установили, что аналог тимина в концентрации 300 мкг/мл проявляет мутагенное действие и вызывает образование резистентных к стрептомицину бактерий. Было показано, что свойство стрептомициноустойчивости этих клеток передается по наследству и не утрачивается при многочисленных пересевах в отсутствие антиметаболита.

О мутациях *E. coli*, ведущих к высоким уровням резистентности к стрептомицину, в результате облучения клеток ультрафиолетом сообщили Dobzanaski (1964) и ряд других авторов.

Такие мутагены, как нитрозогуанидин, метилметансульфонат, дихлофос, при воздействии на бактериальные клетки также приводили к появлению мутантов, устойчивых к различным антибиотикам (Стент, 1974).

В период, охватывающий 50-е годы и начало 60-х годов, для многих исследователей был характерным поиск различий между препаратами ДНК, полученными из устойчивых и чувствительных к антибиотикам бактерий одного и того же вида.

С точки зрения сравнительного изучения хромосомной ДНК устойчивых и чувствительных к антибиотикам вариантов бактерий интересны наблюдения Rolfe et al. (1961), которые на основании данных о трансформации и ультрацентрифугировании трансформирующей ДНК в градиенте плотности ($CsCl$) пришли к выводу, что молекулы ДНК, несущие генетические маркеры, в том числе и резистентности к антибиотикам, характеризуются специфическим нуклеотидным составом.

Экспериментальные исследования убедительно продемонстрировали, что оба типа (хромосомная и плазмидная) резистентности микроорганизмов к антибиотикам имеют в своей основе субклеточные молекулярные структуры, состоящие из ДНК. Это обстоятельство определило довольно заманчивый путь преодоления устойчивости бактерий к лекарственным веществам — применение ДНК-тропных соединений, которые обладали бы свойством элиминировать автономно существующие в цитоплазме микробов *R*- и *RTF*-факторы или необратимо нарушать генетические функции бактериальной хромосомы.

Из большого арсенала ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот наибольший интерес, с указанной точки зрения, представляют вещества, действующие на молекулу ДНК таким об-

разом, что нарушается ее способность функционировать в качестве матрицы в процессах репликации и синтеза РНК.

Среди этих соединений находятся такие препараты, как хинин, атебрин, мирацил D, резохин, барберин, бромистый этидий, производные акридина; антрациклиновые антибиотики: ногаламицин, дауномицин, актиномицин, и некоторые другие вещества.

Необходимо заметить, что большинство из перечисленных веществ представляют собой токсичные соединения, применяемые строго по показаниям (актиномицин, атебрин) или вообще не используемые в медицинской практике. Поэтому материал, представленный в этой главе, следует рассматривать как собрание экспериментальных данных, представляющих интерес для дальнейших разработок в направлении создания безвредных для организма ДНК-тропных лекарственных веществ.

В порядке объяснения механизмов взаимодействия ДНК-тропных веществ с молекулой ДНК предложено две основные гипотезы.

Первая из них рассматривает связывание вещества с молекулой ДНК как результат электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп фосфатно-дезоксирибозного остатка ДНК и положительно заряженных кольцевых структур воздействующего на ДНК соединения, например акридиноранжа. Этот тип связывания обычно является стехиометрическим (1 молекула вещества на 4—5 нуклеотидов ДНК) с довольно низкой константой связывания. Алифатические полиамины, например, спермин, связываются с ДНК исключительно путем такого периферического взаимодействия.

Вторая модель предусматривает интеркаляцию плоских ароматических кольцевых систем (например, бромистый этидий) между двумя уровнями пар оснований двойной спирали ДНК. Этот тип связывания также характеризуется стехиометрией (1 молекула на две пары оснований). Константа связывания при интеркаляции значительно выше, чем при периферическом связывании (Р. Н. Гончарова, 1974).

Пространство для интеркаляции образуется вследствие локального раскручивания (12° вращения) двойной спирали, которое приводит к формированию между соседними парами оснований промежутка ($\sim 0,35$ нм). Молекула интеркалированного вещества находится в вандерваальсовом контакте с парами оснований сверху и снизу. Тесный контакт между π -орбиталями молекулы препарата и пар оснований должен способствовать стабилизации комплекса благодаря гидрофобным силам и взаимодействиям, возникающим при переносе заряда.

К настоящему времени известно большое число антибиотических веществ, способных эффективно взаимодействовать с ДНК: актиномицины, митомицин, хромомидин, митрамицин, оливомицин, хиномицин А, гедамицин, рубифлавин, нетропсин,

дистамицин, блеомицин, флеомицин, лютеоскирин, антрамицин, стрептонигрин-брунеомицин (Гейл и соавт., 1975). Большинство исследователей в качестве критериев изменения ДНК под влиянием различных веществ использовали температурную денатурацию, ИК и УФ-спектрофотометрию, вязкость, седиментационный профиль и биологические показатели: трансформирующую активность, матричные свойства ДНК в РНК- и ДНК-полимеразных системах, а также некоторые другие физико-химические и биологические характеристики ДНК (Kersten et al., 1966). Наиболее полно в этом отношении изучены противоопухолевые антибиотики типа актиномицинов (Wells, 1971), митомицина С (Keizo et al., 1971), антрациклинов (Г. Ф. Гаузе, 1967) и др. Кроме того, за последние годы интенсивно исследовались и многие антибактериальные антибиотики, такие как аминогликозидные препараты, мирацил D, плюрамицин, эхиномицин, антрамицин (Kazuo et al., 1970; Kohn, 1970) и другие, относительно которых установлено, что они могут взаимодействовать с ДНК.

Обобщая данные по взаимодействию ДНК с антибиотиками, можно сделать вывод, что непосредственный контакт ДНК с различными противоопухолевыми и антибактериальными антибиотиками (*in vitro*) или их способность взаимодействовать на уровне клетки (*in vivo*) в большинстве случаев приводит к изменению физико-химических и биологических свойств молекулы ДНК, причем в преобладающем большинстве антибиотиков, связываясь, проявляют специфичность к типу ДНК и ее конформации.

Однако высокая токсичность перечисленных препаратов, их довольно узкий антибактериальный спектр, небольшая специфичность действия препятствует использованию этих веществ в качестве ДНК-тропных ингибиторов устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

«Тем не менее, — как считают Гейл и др. (1975), — возможно, что интеркалирующие свойства молекул в сочетании со способностью некоторых добавочных участков специфически связываться снаружи от расположенных «стопкой» пар оснований, как в случае актиномицинов, могут способствовать созданию специфических препаратов».

Обсуждаются различные возможности модификации некоторых ДНК-тропных веществ, например актиномицина D (Sobell et al., 1971) для использования их в лечебных целях. Осуществляется изыскание микробных штаммов-продуцентов препаратов, направленно действующих на R-факторы бактерий. Уже используются некоторые химиотерапевтические агенты для элиминации эпизомных факторов резистентности (конкретные примеры будут приведены позднее).

Не исключено, что среди известных сравнительно малотоксичных антибактериальных антибиотиков могут быть такие,

которые взаимодействуют с ДНК. Обнаружение этого факта могло бы послужить основой для разработок в направлении повышения эффективности ДНК-тропного действия этих антибиотиков путем их химической модификации, сенсibilизации бактериальной ДНК к повреждающему действию антибиотиков с одновременным использованием веществ, препятствующих нежелательным влияниям ДНК-тропных препаратов на ДНК тканей макроорганизма. Изучение действия антибиотиков на ДНК представляет интерес и в связи с тем, что среди последних обнаружено значительное количество веществ, обладающих мутагенной активностью, проявление которой может приводить к возникновению, наряду с другими мутантами, и антибиотикоустойчивых форм бактерий. В таких случаях, как полагают некоторые исследователи (Р. И. Гончарова, 1974), может оказаться полезным использование антимуутагенов, но для этого необходимо иметь определенные представления о механизмах взаимодействия антибиотиков с ДНК.

Все это послужило причиной проведенного автором с сотрудниками изучения действия тетрациклина, эритромицина и хлорамфеникола на ДНК различного происхождения.

Higuchi, Bolton (1959) исследовали способность тетрациклинов образовывать комплексы с различными органическими и биологическими соединениями, в том числе и с ДНК. Оказалось, что окситетрациклин при определенных условиях может изменять некоторые физико-химические свойства ДНК.

Kohn (1961) изучал взаимодействие тетрациклина с ДНК из спермы лосося и тимуса телят в присутствии двухвалентных катионов.

Методом равновесного диализа и флуоресценции Kohn показал, что в присутствии ионов Mg, Ca и Zn тетрациклин связывается с молекулами как нативной, так и денатурированной ДНК. Этот эффект имел место только в том случае, если в систему ДНК + антибиотик добавлялись ионы двухвалентных металлов. Kohn считает, что связывание ДНК с тетрациклином можно объяснить тем, что тетрациклин, образуя хелаты с ионами металлов, присоединяется к специфическим участкам макромолекулы ДНК.

Л. М. Губерниева и А. Б. Силаев (1964) продемонстрировали взаимодействие тетрациклинов с нуклеиновыми кислотами методом пересекающего электрофореза, при помощи которого можно установить факт комплексообразования и в известной степени судить о силах, возникающих при взаимодействии и устойчивости образующихся комплексных соединений. В работе использовали препараты дрожжевой РНК, рибосомальной РНК из *E. coli* и ДНК из зубной железы телят.

Мутагенный эффект окситетрациклина на бактерии обнаружил Krčmery (1967). Он пишет, что, исходя из структуры окситетрациклина, можно представить, что он действует на ген-

ном уровне, так как наблюдается мутагенное действие окситетрациклина на бактерии (появление мутантов, синтезирующих пенициллиназы). Интересно, что направленность мутагенеза проявлялась в зависимости от типа нуклеотидного состава ДНК.

Одним из факторов, расширяющих возможность применения ДНК-тропных веществ, является снижение проявления нежелательных воздействий таких веществ на ДНК тканей макроорганизма.

Автором с сотрудниками было показано, что такие биологически активные вещества, как спермин, гепарин и гистоны, заметно уменьшают действие солянокислого окситетрациклина на денатурацию ДНК тканей макроорганизма.

По данным литературы (Tabor, 1961, 1962), защитный эффект спермина на ДНК заключается в нейтрализации заряда фосфатных групп ДНК, что увеличивает ее температуру плавления. Это увеличение зависит от длины цепочки полиамина (Thomas, Berns, 1961) и от ионной силы раствора (Tabor, 1962). Наши результаты, полученные при тепловой денатурации ДНК со спермином, согласуются с данными приведенных авторов. Оказалось, что температура плавления ДНК тимуса теленка при добавлении спермина увеличивается на 9°C , а ДНК *Sl. pullorum* — на 4°C (Л. С. Кравченко и др., 1974).

То, что протекторное действие спермина проявляется в конформационной стабилизации молекул ДНК, экспериментально доказано многими исследователями (Bachrach, Eilon, 1969; Eilon, Bachrach, 1969). Работы, проведенные с использованием бактериальных клеток, показывают защитный эффект спермина против лизиса определенных бактерий (Grosswicz, Ariel, 1963). Севаг и де Курси (1970) обнаружили, что спермин предотвращает появление устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов.

В опытах автора с сотрудниками солянокислый окситетрациклин снижал температуру плавления ДНК тимуса теленка и ДНК *Sl. pullorum*. С применением спермина температура плавления ДНК тимуса теленка и ДНК *Sl. pullorum* с солянокислым окситетрациклином при отношении ДНК-антибиотик 1:1 не отличалась от температуры плавления контрольной ДНК. Эти данные можно объяснить, на наш взгляд, следующим образом. При комбинированном использовании солянокислого окситетрациклина и спермина наблюдается взаимный антагонизм между названными препаратами: солянокислый окситетрациклин блокирует действие спермина, проявляющееся в повышении температуры плавления ДНК, а спермин подавляет влияние солянокислого окситетрациклина на ДНК. В результате таких взаимоотношений между препаратами температура плавления ДНК остается неизменной или немного уменьшается в зависимости от концентрации антибиотика. Мы не могли пол-

ностью снять эффект антибиотика (при отношении ДНК — антибиотик 1:2), повышая концентрации спермина, так как при концентрации больше чем 10^{-6} М спермин осаждал ДНК.

При тепловой денатурации ДНК со спермином нами было обнаружено, что спермин значительно больше увеличивал температуру плавления ДНК тимуса теленка, чем ДНК *Sl. pullogum*. В свете этих данных следует отметить, что спермин, встречающийся в естественных условиях преимущественно в различных животных тканях (Tabog and Tabog, 1964), стабилизирует меньше бактериальную ДНК, и, вероятно, этим объясняется избирательный токсический эффект окситетрациклина на бактерии, так как известно, что антибиотик не оказывает серьезного повреждающего действия на животные ткани.

Аналогичные данные были получены при тепловой денатурации ДНК тимуса теленка с гистоновыми фракциями f_1 , f_3 , солянокислым окситетрациклином, аурантином и их сочетаниями. Оказалось, что гистон f_1 в опытах с ДНК тимуса теленка и солянокислым окситетрациклином в большей степени блокировал действие антибиотика, чем гистон f_3 . Это, вероятно, связано с тем, что в реконструированном нуклеогистоне гистоновые фракции обладают различной способностью стабилизировать ДНК. В основе неодинаковой способности стабилизировать ДНК, по-видимому, лежат различия в структуре самих нуклеогистонов, обусловленные различиями во вторичной структуре гистоновых фракций (Боннер, 1967). Наши выводы подтверждаются опытами Huang et al. (1964), которые, применяя различные гистоновые фракции при исследовании искусственных нуклеогистонов, наблюдали предпочтительное связывание гистона f_1 с ДНК. Интересно заметить, что в опытах с ДНК *Sl. pullogum*, гистоновыми фракциями f_1 , f_3 , солянокислым окситетрациклином, аурантином и их комбинациями температура плавления оставалась на уровне этого показателя, полученного при использовании чистой ДНК с антибиотиками, т. е. гистоны не оказывали заметного действия. Мы считаем, что эти результаты указывают на специфичность взаимодействия гистонов с тканевой и бактериальной ДНК, которая определяется, по-видимому, как типом нуклеотидного состава ДНК, так и структурой гистоновых фракций.

Нами изучалась также способность гепарина предохранять ДНК от действия солянокислого окситетрациклина при ее температурной денатурации. Сам гепарин не оказывает влияния на температуру плавления ДНК. Однако в сочетании с ДНК тимуса теленка малые концентрации гепарина полностью или в значительной мере блокируют эффект солянокислого окситетрациклина (в зависимости от концентрации антибиотика) на ДНК. В этом смысле гепарин представляется ценным препаратом для снижения токсических свойств солянокислого окситетрациклина. Известно, что гепарин содержится только в живот-

ных тканях и обладает способностью понижать токсические свойства многих антибиотиков (Малек, Кольц, 1960). Установлено, что гепарин снижает побочное действие антибиотиков тем быстрее, чем выше его концентрация. В свою очередь, антибиотики образуют комплексы с гепарином, что приводит в ряде случаев к снижению их противомикробной активности (Л. М. Губерниев, А. Б. Силаев, 1964). Было показано, что непосредственное взаимодействие гепарина с солянокислым окситетрациклином не сопровождается инактивацией антибиотика. Надо полагать, что гепарин может понижать токсические воздействия солянокислого окситетрациклина в животных тканях, не препятствуя токсическому эффекту антибиотика на бактериальную клетку в условиях организма.

Другая серия исследований, проведенных в нашей лаборатории (А. Я. Ровинская и др., 1970; А. Я. Ровинская, 1973) была посвящена изучению взаимодействия ДНК (различного происхождения) с хлорамфениколом и эритромицином. В качестве методического подхода для оценки изменений различных функций ДНК под влиянием хлорамфеникола или эритромицина мы использовали как биологические (генетическая трансформация, гибридизация, РНК-полимеразная система), так и физико-химические (температурная денатурация, чувствительность к нуклеазам, УФ и ИК-спектры, равновесный диализ) методы исследования.

Исследования последних лет показали, что механизм действия того или иного антибиотика на клетку следует рассматривать как совокупность множественного действия препаратов на различные системы и структуры клетки.

Использованные антибиотики, хлорамфеникол и эритромицин, довольно хорошо изучены в отношении воздействия их на синтез белка. Сведения о влиянии эритромицина на различные функции ДНК в литературе практически отсутствуют. Что касается хлорамфеникола, то имеются сообщения о его тератогенном действии (Anderson, 1967), о подавлении митотического процесса (Mitus, 1970). Однако при этом большинство авторов считает, что хлорамфеникол воздействует на ДНК опосредованно, подавляя синтез определенных белков, ответственных за инициацию репликации хромосомы (Mathison, 1968).

Применение температурной денатурации позволило А. Я. Ровинской с соавт. обнаружить влияние эритромицина на характер плавления различных видов ДНК. Наблюдалось повышение температуры плавления ($T_{пл}$) ДНК зубной железы и гемолитического стрептококка. $T_{пл}$ ДНК кишечной палочки в присутствии эритромицина не изменялась.

В этих же опытах была установлена зависимость действия эритромицина на чувствительность ДНК к ДНК-азе от нуклеотидного состава самой ДНК. ДНК кишечной палочки ($A + T/G + C \approx 1,0$) гидролизовалась в присутствии эритромицина

полностью. ДНК гемолитического стрептококка ($A+T/G+C=1,94$) и тимуса теленка ($A+T/G+C=1,36$) под влиянием антибиотика становились более устойчивыми к ферментативному гидролизу. Кроме того, была установлена зависимость степени подавления гидролиза ДНК от концентраций: увеличение дозы эритромицина обуславливало более выраженный ингибирующий эффект гидролитической реакции.

Применение различных химических агентов позволило нам более полно охарактеризовать действие эритромицина на ДНК.

В опытах по температурной денатурации сперми снимал действие эритромицина на ДНК. На основании этих результатов в сочетании с фактом подавления эритромицином гидролитического действия панкреатической дезоксирибонуклеазы можно сделать вывод о конкурирующих взаимоотношениях между эритромицином и спермином за отрицательно заряженные фосфатные группировки в молекуле ДНК.

Результаты анализа инфракрасных спектров коррелировали с изложенными данными, подтверждая предположение о наличии двух способов стабилизации (водородном и электростатическом) эритромицином двойной спирали полинуклеотида.

Следует отметить, что другой изучаемый антибиотик хлорамфеникол не оказывал влияния ни на температурную денатурацию ДНК, ни на их чувствительность к нуклеазе. Действие эритромицина на генетическую трансформацию (в нашей работе) исследовали путем воздействия антибиотика непосредственно на ДНК, выделенную из штамма донора гемолитического стрептококка, и на ДНК, полученную из донорских клеток этой же культуры, предварительно обработанных эритромицином. Результаты проведенных опытов согласуются с представлением о стабилизирующем действии антибиотика на ДНК. Высокие концентрации эритромицина (1000, 100, 50 мкг/мл) полностью лишали нуклеиновую кислоту ее трансформирующей способности. Снижение концентрации обуславливало уменьшение ингибирующего эффекта антибиотика, но и при минимальных дозах последнего биологическая активность ДНК гемолитического стрептококка подавлялась в 2,5—8 раз. Интересно отметить, что ДНК, выделенная из культуры, обработанной суббактериостатическими концентрациями эритромицина, была менее активна в опытах по трансформации, чем препарат, полученный из клеток, обработанных бактериостатическими концентрациями антибиотика.

Анализируя результаты физико-химических исследований влияния эритромицина на ДНК в совокупности с данными экспериментов по генетической трансформации, можно предположить, что способствуя упрочнению двойной спирали ДНК путем водородного и электростатического воздействия на ее молекулу, антибиотик препятствует расплетению нитей ДНК внутри реципиентной клетки, вследствие чего происходит подав-

ление трансформирующих свойств ДНК гемолитического стрептококка.

Установив способность эритромицина влиять на генетические функции ДНК, интересно было изучить его воздействие на матричные свойства дезоксирибонуклеиновой кислоты. С этой целью была выбрана РНК-полимеразная система ДНК-зависимого синтеза РНК и метод гибридизации ДНК с комплементарными участками РНК, где в обоих случаях ДНК выполняет роль матрицы. Оказалось, что синтез РНК на матрицах, обработанных эритромицином, так же как процесс гибридизации с участием аналогичных ДНК, подавлялся, причем эффективность ингибирования зависела от нуклеотидного состава ДНК. Самое незначительное подавление синтеза РНК наблюдалось в тех случаях, когда в качестве матрицы использовали ДНК кишечной палочки ($A+T/G+C=1,0$). Соответствующий эффект был установлен и в опытах по гибридизации, где степень гибридизации меченой P^{32} РНК с ДНК кишечной палочки, обработанной эритромицином, практически не отличалась от таковой в контрольных опытах. С увеличением АТ-групп в молекуле ДНК подавление матричных свойств ДНК эритромицином усиливалось и наиболее выражено было в опытах с ДНК гемолитического стрептококка.

Результаты опытов по гибридизации согласуются с данными о стабилизирующем действии эритромицина. Известно (Джиллеси, 1970), что для формирования комплекса ДНК—РНК необходимо наличие однонитевой формы ДНК. Учитывая обнаруженную способность эритромицина упрочнять молекулу ДНК с помощью водородного и электростатического взаимодействия, можно предположить, что основной причиной снижения процента гибридизации в присутствии антибиотика является недостаточно полное расплетение комплементарных нитей ДНК. В тех местах цепи, где эритромицин дополнительно укрепляет биспираль, помогая сохранять этим участкам нативное состояние, комплементарные участки РНК не способны спариваться с ДНК, что и приводит к подавлению процесса гибридизации. Эти выводы совпадают с выводами Smith (1966). Автор сообщил, что ДНК, выделенная из различных штаммов *E. coli*, обработанных митомицином С, снижала способность необработанной ДНК формировать гибриды с м-РНК. Способность митомицина С образовывать ковалентные сшивки дала возможность автору предположить, что антибиотик препятствует расхождению нитей ДНК, тем самым уменьшая ее эффективность в формировании гибридов.

Действие эритромицина на РНК-полимеразную реакцию носит более сложный характер из-за многокомпонентности системы. Сложность интерпретации полученных данных заключается в том, что антибиотик может вызывать подавление синтеза РНК не только за счет влияния на ДНК, но и воздействуя на

функции РНК
большое количе
ков на ДНК-з
Одни, такие к
(Scilaqui, 1971
не связываясь
фермента. Др
et al., 1970)
синтез РНК
случае подавл
шением содер
В опытах
о подавлении
на ДНК-матр
мости степени
зуемой матр
обладает сро
Огест, 1965).
Изучение
обработкой
явление в ре
вых разрывс
способных с
ных расплет
была также
(1971), в ко
дуцированн
Berg (1964)
Каменецкий
по отношен
зуркин и д
ется вероя
ствия ДНК
туры ДНК
эффективн
цей. Ю. Р
РНК-поли
при обраб
вышении
вают на в
и полимер
имодестр
курующую
полимера
же пока
ферментс
роксильн
авторов,

функции РНК-полимеразы. В литературе имеется довольно большое количество данных о влиянии различных антибиотиков на ДНК-зависимый синтез РНК в бесклеточной системе. Одни, такие как стрептомицин (Satoschi, 1968), рифамицин (Scilaqui, 1971), угнетают РНК-полимеразную реакцию *in vitro*, не связываясь с ДНК, а действуя непосредственно на функции фермента. Другие антибиотики, типа дистамицина (Chandra et al., 1970), мирацила D (Weinstein et al., 1971), подавляют синтез РНК за счет взаимодействия с ДНК-матрицей. В этом случае подавляющее действие антибиотиков ослаблялось повышением содержания ДНК в РНК-полимеразной системе.

В опытах автора с сотрудниками в пользу предположения о подавлении эритромицином синтеза РНК путем воздействия на ДНК-матрицу свидетельствует факт специфической зависимости степени ингибирования от нуклеотидного состава используемой матрицы. Кроме того, известно, что РНК-полимераза обладает сродством к денатурированной форме ДНК (Хурвиц, Огест, 1965).

Изучение синтеза РНК на ДНК-матрицах, поврежденных обработкой ДНК-азой (Goddard et al., 1970), показало, что появление в результате действия дезоксирибонуклеазы односторонних разрывов приводит к возникновению на ДНК новых мест, способных связывать РНК-полимеразу. Необходимость локальных расплетений нитей ДНК при синтезе ДНК-зависимой РНК была также продемонстрирована работами Kasagana et al. (1971), в которых исследовали синтез РНК на матрицах с индуцированными поперечными сшивками. Более того, Wood, Berg (1964), О. С. Лазуркин, В. П. Пермогоров, М. Д. Франк-Каменецкий (1968) считают, что РНК-полимераза обладает по отношению к ДНК деспирализующим действием (О. С. Лазуркин и др., 1966). В свете приведенных данных представляется вероятным влияние эритромицина на процесс взаимодействия ДНК с ферментом. Упрочнение двуспиральной структуры ДНК в присутствии эритромицина, возможно, снижает эффективность связывания РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. Ю. В. Козлов и Г. П. Георгиев (1967) установили, что РНК-полимераза может быть вытеснена из комплекса с ДНК при обработке полиамином (стрептомицинсульфатом) и при повышении ионной силы. По мнению авторов, эти данные указывают на возможность электростатического взаимодействия ДНК и полимеразы. Учитывая аналогичный эффект спермина на взаимодействие ДНК с эритромицином, можно заключить о конкурирующих взаимоотношениях между эритромицином и РНК-полимеразой за общие места взаимодействия с ДНК. Было также показано торможение РНК-полимеразой действия других ферментов, для которых необходимо наличие свободных 3'-гидроксильных концевых групп молекулы ДНК. По мнению ряда авторов, это свидетельствует о существовании специфических

мест в ДНК (свободные 3'ОН-группы), по которым и происходит присоединение фермента (Ю. В. Козлов, Г. П. Георгиев, 1967; Antony et al., 1969). Используемая в нашей работе панкреатическая дезоксирибонуклеаза разрывает фосфодиэфирные связи в полинуклеотидной цепи между углеродом в 3'ОН-положении и фосфатом. Эритромицин ингибировал действие данного фермента. Следовательно, 3'ОН-группы — именно те места воздействия, за которые эритромицин и РНК-полимераза могут конкурировать. На основании такого предположения ингибирование РНК-полимеразной системы отчасти можно объяснить блокировкой 3'ОН-групп эритромицином, вследствие чего снижается эффективность ДНК в качестве матрицы.

Изучение хлорамфеникола в биологических опытах показало, что данный антибиотик незначительно изменял биологическую активность ДНК и только при высоких концентрациях. Он также оказывал подавляющее действие на матричные свойства ДНК, но при этом зависимости от нуклеотидного состава матрицы обнаружено не было. То, что в физико-химических исследованиях влияние хлорамфеникола на ДНК не было установлено, а подавление биологических и матричных свойств наблюдалось только при высоких концентрациях и без специфической зависимости от типа оснований в препаратах ДНК, позволяет сделать вывод о неспецифическом влиянии хлорамфеникола на молекулу ДНК.

Обобщая полученные данные по влиянию эритромицина на биологические и физико-химические свойства ДНК, можно сделать вывод о способности данного антибиотика воздействовать на генетический аппарат клетки.

Так как степень воздействия эритромицина находится в зависимости от типа ДНК и проявляется более выражено с увеличением содержания аденина и тимина в молекуле ДНК, представляется возможным его нежелательное действие на клетки ткани в связи с тем, что тканевая ДНК, как правило, АТ-типа.

Эритромицин широко применяется в медицинской практике. Токсичность данного антибиотика невелика. Мыши перорально переносят однократно эритромицин в дозах порядка 2000 мг/кг. Длительное двухнедельное введение эритромицина собакам и мышам не вызывает симптомов интоксикации. Однако полученные данные могут объяснить те проявления токсического действия некоторых производных антибиотика (нлозон), которые, создавая высокие концентрации эритромицина в организме, действовали на паренхиму печени (Tuppiwal et al., 1954). Установлено, что через 2 ч после приема антибиотика содержание в 1 г ткани превышало концентрацию его в 1 мл сыворотки крови: в печени — в 13,5, поджелудочной железе — в 8,4, селезенке — в 4,1, надпочечниках — в 3,6, в слюнной железе — в 2,9 и в легких — в 1,7 раза. В связи с этим при неоднократном введении в организм эритромицина нельзя исключить его кумулятивное

действие, которое в свете полученных нами данных о влиянии эритромицина на различные биологические и физико-химические свойства ДНК (АТ-типа) может проявиться в воздействии данного антибиотика на генетическую систему человеческого организма. Это обстоятельство требует, чтобы в распоряжении медиков имелись препараты, способные защитить молекулы ДНК тканей от поражающего действия антибиотиков. Наличие таких веществ могло бы сыграть положительную роль и в преодолении лекарственной устойчивости микроорганизмов, так как это позволяет создавать высокие концентрации антибиотиков в тканях организма с меньшим риском вызвать нежелательные последствия.

Как уже отмечалось, некоторые антибиотические вещества могут быть довольно сильными мутагенами. Известно, что основным условием мутагенности определенного химического соединения является его ДНК-тропность (Стент, 1974). В связи с этим полученные в лаборатории автора данные о взаимодействии тетрациклина и эритромицина с молекулами ДНК можно рассматривать как основание для отнесения названных антибиотиков в группу биологически активных веществ с потенциальной мутагенной активностью. Lenhart (1969) в опытах *Microsporum* обнаружил, используя три независимых метода, появление в культуре дерматофита мутантов в результате воздействия гризеофульвина.

Особенно много в литературе опубликовано данных о мутагенном действии стрептомицина (Н. П. Дубинин и др., 1961; Т. Ф. Закирова, 1971). Например, стрептомицин проявил себя как мутаген прежде всего в отношении нехромосомных генов (опыты проводились с *Chlamydomonas reinhardtii*), что было подтверждено флуктуационным тестом и методом Ньюкомба. Необходимо отметить, что стрептомицин был первым антибиотиком, для которого доказано взаимодействие с ДНК.

Имеются сообщения о мутагенном действии тетрациклина (Křtmer, 1967), неомицина и гигромицина (М. И. Пронина и др., 1973) и ряда других антибиотиков.

Описаны также результаты воздействия антибиотиков на клетку, которое можно рассматривать как весьма близкое к мутагенному эффекту, в частности хромосомные aberrации под влиянием митомицина С (Kury et al., 1967), хлорамфеникола, стрептонигрина (Cohen, 1963), тератогенное действие хлорамфеникола (Anderson, Battle, 1967), леворина и гризеофульвина (Н. Н. Слоницкая и др., 1961) и др. Таким образом, в литературе опубликовано достаточное количество данных, чтобы предположить возможную роль мутагенного действия антибиотиков в увеличении числа антибиотикоустойчивых мутантов патогенных микроорганизмов. Отсюда не исключено, что некоторые из известных антимутагенов могут представить интерес в аспекте их использования в качестве средств, способствующих

преодолению лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний.

Первым из исследователей, кто попытался найти химические вещества, препятствующие возникновению резистентных вариантов микроорганизмов, был Sevag et al. (1962, 1964), которые в опытах со *S. aureus* и *E. aerogenes* обнаружили, что спермин и спермидин в комбинации со стрептомицином, пенициллином, эритромицином могут полностью, а в сочетании с тетрациклином и хлорамфениколом — частично предотвращать появление устойчивых к перечисленным антибиотикам клеток. При этом оказалось, что сами полиамины не обладали антибактериальными свойствами. Давая объяснение природе наблюдаемого явления, Sevag et al. предположили, что спермин и спермидин могут быть антимутагенными агентами и что местом приложения их антимутагенного действия является ДНК.

По данным Sevag (1964), хинакриин (атебрин) также обладал свойством подавлять развитие устойчивости к ряду сульфаниламидов и антибиотиков некоторых видов бактерий. Bach, Johnson (1971) провели серию работ по выяснению возможности уменьшения частоты возникновения спонтанных и индуцированных мутаций с помощью спермина и хинакрина. Они изучали возникновение прямых мутаций устойчивости *E. coli* и *S. aureus* к стрептомицину. Во всех случаях, когда бактерии выращивались в присутствии 150 мкг/мл спермина, частота появления стрептомициноустойчивых мутантов была в 2—3 раза ниже, чем в контроле. При добавлении спермина к культуральной среде не было отмечено различий в интенсивности роста чувствительных или устойчивых к стрептомицину бактерий, что не позволяет объяснить наблюдаемые различия в частоте мутации селективным действием.

Антимутагенный эффект спермина был более выраженным при индуцированных кофеином и ультрафиолетом мутациях. Мутагенность кофеина под влиянием спермина уменьшалась в 12 раз, а ультрафиолета — примерно в 9 раз.

В целях выяснения механизма антимутагенного действия спермина и хинакрина Bach, Johnson (1971) изучили влияние названных веществ на частоту спонтанных мутаций у штамма *E. coli* с определенным генотипом (Treffers et al., 1954), характерной особенностью которого является необычная специфичность, приводящая к замене пар оснований (в результате воздействия мутагена) только одного типа: пары АТ на пару ГЦ, что указывает на связь действия мутатора с процессом репликации. В других опытах авторы изучали влияние спермина и хинакрина на частоту мутаций, индуцированных 2-аминопурином, действие которого также отмечается во время репликации. Было найдено, что спермин в концентрации 100—150 мкг/мл уменьшал число устойчивых к стрептомицину мутантов на 30—50% у штамма с мутаторным геном. Более эффективным анти-

мутагеном оказался хинакрин, снижающий частоту спонтанных мутаций в среднем в 5 раз. Полученные И. М. Терешиним и др. (1974а) данные о действии спермина и спермидина на устойчивость бактерий к хлорамфениколу и стрептомицину показали, что спермин снижал число устойчивых клеток *E. coli* к хлорамфениколу в 1,5—2 раза. Наиболее отчетливое действие спермина наблюдалось при высоких концентрациях (200—400 мкг/мл). Устойчивость к хлорамфениколу в присутствии спермидина снижалась примерно в 4 раза при концентрации полиаминна 50—100 мкг/мл. Спермидин незначительно (в 1,2—1,4 раза) снижал число устойчивых клеток *S. aureus* к хлорамфениколу. В отношении резистентности к стрептомицину действие спермидина при совместном использовании с антибиотиком было более интенсивным: число резистентных клеток снижалось в 1,5—2 раза.

Антимутагенный эффект суббактериостатических концентраций спермина был подтвержден исследованиями Weinstein et al. (1967) и ряда других авторов.

Как было показано Р. Я. Галановой (1968), акрихин в концентрации 150 мкг/мл задерживал развитие резистентности *S. aureus* к оксациллину и стрептомицину. При 80 мкг/мл акрихина развитие устойчивости предотвращалось не во всех случаях, а при 20 мкг/мл вовсе не отмечалось влияния на процесс развития резистентности. Однако при изучении влияния акрихина на частоту мутации устойчивости *S. aureus* к мономицину, оксациллину и стрептомицину автор не получила достаточно убедительных доказательств наличия антимутагенного действия акрихина, что дало ему основание сделать предположение о подавлении акрихином фазы адаптации у потенциально устойчивых микроорганизмов. По мнению автора, в пользу этого предположения свидетельствуют данные В. Н. Соловьева (1973) о способности акридинов угнетать индуцированный синтез пенициллиназы у *S. aureus*.

В 1971 году Bach, Johnson (1971) осуществили изучение антимутагенной активности около 200 химических соединений, обращая особое внимание на роль химической структуры вещества в проявлении антимутагенного действия. С этих позиций авторы проанализировали значение характера алкильной боковой цепи антимутагенов, влияние изменений локализации аминогруппы в акридиновом ядре, а также введения различных «активизирующих групп» в хинолиновое ядро. Было установлено, что антимутагенная активность хинакрина не связана с наличием у него сперминоподобной боковой цепи. Сравнение с наличием у него сперминоподобной боковой цепи. Сравнение активности ряда производных хинолина и хинакрина с одинаковыми боковыми радикалами показало большую активность хинакринового ядра. Введение гидрофильных групп по соседству с аминогруппой боковой цепи приводило к заметному увеличению антимутагенной эффективности. Отмечена большая разница в активности между производными с одной и двумя

аминогруппами, особенно наглядную при сравнении 3-аминоакридина и 3,6-диаминоакридина (профлавина). Последний оказался наиболее активным антимутагеном среди исследованных аминопроизводных акридина; 7-хлор-замещение в хинолиновом ядре сопровождалось выраженным активизирующим эффектом. Алифатические полнамины были менее активными по сравнению с гетероциклическими полнаминами, среди которых наиболее активными антимутагенами проявили себя бромистый этидий и некоторые бензакридины.

Как показано рядом исследователей, развитие лекарственной устойчивости *E. coli*, *S. aureus*, *Myc. tuberculosis*, *E. aerogenes* удается предотвратить при их выращивании в средах, содержащих полнамины (спермин, спермидин) или атсбрин в комбинации с различными антибиотиками (Smekal et al., 1966, и др.).

Опубликован патент США на изобретение способа предупреждения возникновения резистентных к антибиотикам форм *S. aureus*, *E. coli* и *E. aerogenes* (1969), в котором предлагают использовать сочетания антибиотиков с антимутагенными веществами, список которых включает спермин, спермидин, хинакрин, хлорпромазин, циклобензакрин, прометазин, 3-хлор-дибензоциклогептан и левомепромазин.

В лаборатории А. Ф. Мороз (1971) проведен цикл работ по предотвращению развития лекарственноустойчивых вариантов *E. coli* и *S. aureus* антибиотиками в сочетании с ДНК-тропными веществами. В опытах с *E. coli* при продолжительном (до 72 ч) культивировании бактерий с ампициллином (0,99 мкг/мл) в комбинации с акрихином (125 мкг/мл), аминазином (25 мкг/мл) и 6-меркаптопурином (5 мкг/мл) наблюдалось предупреждение развития устойчивости микробов к антибиотику. Аналогичное отсутствие нарастания устойчивости к неомицину отмечали авторы при сочетании антибиотика с аурантином (25 мкг/мл), хлорохином (25 мкг/мл), 6-меркаптопурином (5 мкг/мл) и акрихином (125 мкг/мл). Предотвращение устойчивости сопровождалось в экспериментах с обоими антибиотиками снижением числа жизнеспособных клеток.

Использование таких ДНК-тропных соединений, как акрифлавин (12,5 мкг/мл), акрихин (100 мкг/мл), 6-меркаптопурин (5 мкг/мл), хлорацетин (25 мкг/мл), подавляло повышение устойчивости культуры *S. aureus* к пенициллину и новобиоцину (А. М. Подборонов, 1972).

Кодмермицин А в значительной степени снижал возможность появления клеток *S. aureus*, устойчивых к метициллину и цефалотину (Dan et al., 1969).

По данным Г. Н. Нещадима (1972), из препаратов акридинового ряда эффективным в аспекте предупреждения формирования антибиотикорезистентных к неомицину микроорганизмов оказался лишь акрихин. Из препаратов фенотиазинового ряда такая способность была обнаружена у трифтазина, остальные

вещества это
только торм
E. coli. Комб
антибактериа
было недоста
ноустойчивы
держивал, н
числа клеток

В работе
венном инги
лочки к стр
акрифлавин
тетический
слота, как
переход чун
terium sp. в

Наиболе
suhashi, 197
элиминации
робных кле

Первым
флавина и
gota et al.

в опытах
gella и *E.*
ственно. А
избирател
клетках. С
ствия акр
1966) и *S.*
группы D
к тетраци
мицину и
показано
штаммов
ных в р
вином, в

Суточ
биотикам
с добав
ровало
пата —
тентного
только
веществ
На
вают и
устойчи

вещества этой группы (этаперазин, метеразин, фторацизин) только тормозили появление устойчивых к неомицину клонов *E. coli*. Комбинация неграма с неомицином оказывала сильное антибактериальное действие на тест-культуру, однако и это было недостаточно для предупреждения образования неомициноустойчивых бактериальных клеток. Кофеин с неомицином задерживал, но полностью не предупреждал процесс увеличения числа клеток, устойчивых к неомицину.

В работе И. Г. Кожухарь и др. (1967) сообщается о существенном ингибировании развития устойчивости кишечной палочки к стрептомицину и протей к рифампицину под влиянием акрифлавина, акридина и других акридиновых препаратов. Синтетический препарат — 4-хлоранилид-5-хлорсалициловая кислота, как сообщают Kostrzenski et al. (1973), предотвращал переход чувствительной к стрептомицину популяции *Mycobacterium* sp. в устойчивую.

Наиболее перспективным направлением исследований (Mitsuhashi, 1971) является применение ДНК-тропных веществ для элиминации *R*-факторов из резистентных к антибиотикам микробных клеток.

Первыми, кто обнаружил элиминирующее действие акрифлавина и хиначрина (атебрина), были японские ученые Hirota et al. (1957), Mitsuhashi (1971), Watanabe et al. (1961a), в опытах которых элиминация *R*-факторов из *Salmonella*, *Shigella* и *E. coli* происходила с частотой 50%, 5% и 1% соответственно. Авторами был сделан вывод, что названные вещества избирательно подавляют репликацию *R*-факторов в донорских клетках. Сходные результаты были получены при изучении действия акрифлавина на *R*⁺-штаммы *S. marcescens* (Rownd et al., 1966) и *S. aureus* (Т. Г. Сионская, 1970). Штаммы *Str. faecalis* группы D были «излечены» бромистым этидием от устойчивости к тетрациклину, а акрифлавином — от устойчивости к эритромицину и тетрациклину. С помощью ультрацентрифугирования показано наличие плазмидной ДНК у исходных устойчивых штаммов. У чувствительных вариантов стрептококков, полученных в результате обработки резистентных штаммов акрифлавином, внехромосомная ДНК отсутствовала.

Суточное культивирование резистентных к различным антибиотикам штаммов *E. coli*, *Salmonella* и *Shigella* в бульоне с добавлением $60-2500 \cdot 10^6$ М бромистого этидия элиминировало из устойчивых бактерий некоторые *R*-факторы: у *S. paratyphi* — устойчивость к канамицину, у штамма *S. derby*, резистентного к стрептомицину, сульфаниламидам и ампициллину, — только устойчивость к последнему из названных лекарственных веществ.

На избирательность действия ДНК-тропных веществ указывают и другие исследователи. Например, у ряда антибиотикоустойчивых энтеробактерий после обработки акрифлавином и

акридином не удавалось добиться элиминации резистентности к тетрациклину, эритромицину и левомецитину, в то время как большинство других *R*-факторов оказались чувствительными к названным красителям.

Г. Н. Нещадим (1972) предпринял попытку выяснить некоторые механизмы элиминации *R*-факторов бактерий различными химическими соединениями.

При изучении элиминирующей способности рифампицина, фурагина, бромистого этидия, неграма и пиронина в отношении штамма *E. coli* R^+ (устойчивого к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу, неомицину и сульфаниламидам) была отмечена полная утрата *R*-фактора соответственно у 8—12, 2,1—3,8 и 3,1% колоний. В некоторых случаях наблюдалась лишь частичная элиминация или сегрегация маркеров устойчивости к стрептомицину или неомицину. Таким же невысоким был уровень элиминации *R*-факторов из диких штаммов кишечной палочки, шигелл, клебсиелл. Обработка бромистым этидием вызывала полную потерю *R*-фактора лишь у незначительного числа клеток (0,95%) одного штамма клебсиелл. Брунеомицин обуславливал потерю *R*-фактора у 0,34% клеток кишечной палочки. Остальные препараты не элиминировали *R*-фактор полностью: наблюдалось устранение лишь отдельных детерминантов резистентности к антибиотикам.

Таким образом, в отличие от ряда зарубежных исследователей (Johnston et al., 1970; Mandi et al., 1974) автору не удалось выявить высокой элиминирующей активности рифампицина и бромистого этидия, из чего он делает заключение, что способность к элиминации в значительной мере зависит от природы штаммов хозяев, несущих *R*-факторы. На основании большого экспериментального материала Г. Н. Нещадим. предполагает, что одним из механизмов элиминации *R*-факторов из клеток является повышенная чувствительность R^+ -клеток к элиминирующим агентам, в частности к рифампицину и в меньшей степени к фурагину, что способствует селективному отбору и накоплению R^- -клонов. Однако он не исключает возможности и «истинных» элиминаций *R*-факторов, главным образом при участии бромистого этидия.

Б. А. Шендеровым (1971) было осуществлено изучение *in vitro* возможности элиминации *R*-факторов и ингибирования у кишечных бактерий фенотипической экспрессии входящих в его состав *r*-детерминантов под влиянием антигистаминных препаратов: димедрола (хлоргидрат β -диметиламиноэтиловый эфир бензгидрола), супрастина (хлоргидрат *N*-диметиламиноэтил-*N*-*p*-хлорбензил- α -аминопиридин) и двух производных фенотиазина — пипольфена, хлоргидрат *N*-(2-диметил-аминопропил)-фенотиазин, и аминазина, хлоргидрат *N*-(3-диметиламинопропил)-2-хлор-фенотиазин. Культивирование кишечных бактерий в присутствии суббактериостатических концентраций антигистамин-

ных препаратов приводило к элиминации лекарственной устойчивости у взятых в опыт штаммов *E. coli*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnae*, *S. typhimurium*, *S. london*. Процент колоний, стабильно утративших *R*-факторы или отдельные детерминанты устойчивости, колебался в пределах от 0 до 40 и зависел от индивидуальных особенностей штаммов, типа *r*-детерминант, препарата и времени контакта бактерий с ним. Наибольшая частота потери устойчивости к антибиотикам наблюдалась под влиянием супрастина, затем пипольфена и аминазина; наименее выраженным был элиминирующий эффект у димедрола. У штамма *E. coli* R_2^+ , устойчивого к мономицину и ампициллину, частота появления бактерий, чувствительных к антибиотикам, была выше, чем у штамма *E. coli* R_1^+ , резистентного к тетрациклину и левомецитину. Среди бактерий *E. coli* R_2^+ , утративших устойчивость к антибиотикам, наиболее часто обнаруживали сегреганты, чувствительные к ампициллину, реже к мономицину и канамицину, хотя встречались колонии, ставшие одновременно чувствительными ко всем 3 антибиотикам. Автор отмечает, что механизм элиминации плазмидной резистентности у бактерий под влиянием антигистаминных препаратов требует дополнительных исследований.

В литературе отмечалось, что противораковый антибиотик саркомицин (Ikeda et al., 1967) элиминирует *R*-фактор *E. coli* с частотой 35—45%. Опираясь на эти данные, Н. С. Бродникова и др. (1970) провели изучение возможности полного или частичного удаления детерминантов резистентности из *R*-фактора с помощью противоракового антибиотика аурантина, подавляющего зависимый от ДНК синтез РНК. Было обнаружено, что аурантин в концентрации 250 мкг/мл элиминировал входящие в состав *R*-фактора детерминанты резистентности к тетрациклину, левомецитину, стрептомицину и сульфадимезину у одного из двух взятых в опыт штаммов *E. coli*, устойчивых к антибиотикам, с частотой 0,5%. При комбинированном воздействии аурантина и УФ-лучей на штамм *E. coli* происходило значительное увеличение (от 0,5 до 30,4%) *R*-колоний, клетки которых были способны вновь приобрести *R*-фактор при скрещивании со штаммом *E. coli* SCH-222 с частотой 10^{-3} .

Заслуживают внимания попытки исследователей направленно синтезировать химические соединения, обладающие свойством элиминации эпизомных факторов.

Испытания большого количества полученных путем химического синтеза веществ позволили найти два соединения: 2,4-(4,6-диамино-1,2-дигидро-2,2-диметил-9-триазин-фенил-4)-ацетанимид-этансульфонат и бутилбензонил-3-метил-1-фенил-2-пиразолил, которые довольно эффективно элиминировали из *S. aureus* плазмиды, контролирующие синтез β -лактамаз.

Jorgensen et al. (1974) в результате изучения элиминирующего действия трех противогельминтных препаратов со следую-

шими коммерческими названиями: септурон, банминт и тибензол — установили, что указанные вещества устраняли из штамма *E. coli* *r*-детерминанты устойчивости к неомицину, ампициллину, стрептомицину, сульфаниламидам, тетрациклину, хлорамфениколу с частотой от 1 до 19%. Наиболее эффективным был септурон (19%).

Представляет интерес серия работ Pinney и соавт. (1971, 1974), в которых элиминация *R*-факторов достигается в условиях так называемой «бестиминной смерти» или вследствие обработки *R*⁺-бактерии, ингибиторами тимидилатсинтетазы. В частности, было показано, что фтордезоксипуридин (100 мкг/мл) элиминировал с частотой до 15% *R*-факторы из клеток *E. coli*; фторурацил оказывал аналогичное действие, но его элиминирующая активность была в 3 раза ниже.

Обширные исследования элиминации различных детерминантов резистентности провели Hahn и Ciak (1971). В своих опытах они использовали штамм *E. coli* RS-2, устойчивый к канамицину, хлорамфениколу, ампициллину, стрептомицину и сульфадиазину, и гентамицинорезистентный штамм *Klebsiella pneumoniae* *R*⁺. В качестве элиминирующих веществ в суббактериостатических концентрациях (10^{-4} М) применяли бромистый этидий, хинакрин, акридиноранж, берберин, спермин, хинин, хлорохин, *p*-розанилин и метиленовую синь. Наиболее эффективная элиминация была отмечена при добавлении в питательную среду, где культивировали микроорганизмы, бромистого этидия, хинакрин и акридиноранжа. Наибольшую чувствительность к действию антимуагенов проявили детерминанты резистентности к канамицину, хлорамфениколу и гентамицину. В этой связи можно напомнить данные о спонтанной потере *r*-детерминант канамициноустойчивости и хлорамфениколоустойчивости у штамма *S. typhimurium* *R*⁺ и выраженной стабильности детерминант устойчивости к ампициллину, стрептомицину и сульфаниламидам.

Нельзя не остановиться на серии работ, выполненных Yoshikawa в 1967—1975 годах, который давно занимается поиском путей преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов. В 1967 году Yoshikawa et al. (1967), работая в лаборатории Севага, которого с полным правом можно назвать основателем этого направления исследований, показали, что *R*⁺-штаммы *E. coli* более чувствительны к действию атебрина (120 мкг/мл), чем *R*⁻-клетки, и что эта повышенная чувствительность бактерий обусловлена наличием *R*-фактора (*R*⁻-клетки, «излеченные» от *R*-фактора сочетанием УФ и акридиноранжа, приобретали высокую устойчивость к атебрину, а *R*⁺-клетки, полученные в результате реинфекции *R*-фактором, становились высокочувствительными). После воздействия атебрином на бактериальные клетки *R*⁺-штамма в популяции бактерий начинали с высокой скоростью накапливаться *R*⁻-клетки, рост которых довольно

эффективно по
hikawa, 1971a)
ток была обна
венных веществ
новых красите
В 1971 год
вающего» дей
пегі и *S. typh*
единственным
нов является
числа *R*⁻
В 1974 год
можно приме
биторами рег
множение ба
тает использ
E. coli, получ
сированного
«разрешенной
тенциальным
испытываемый
штамма под

Недавно
R⁺- и *F*⁺-кле
гамицина, ч
На ранних с
для бактери
сегрегантов,
зистентных
автор объяс
ким образом
R⁺-клеток
с этим авто
нять препа
устойчивост
На возм
числе детер
с помощью
linsky et al
и др. Есть
пицина (Jo
дина (Н. Т
Исклю
в лаборат
действии
торых вхо
штамма:
100⁺ (усто

эффективно подавлялся хлорамфениколом. В дальнейшем (Yoshikawa, 1971a) подобная повышенная чувствительность R^+ -клевенных веществ, таких как налидиксовая кислота и ряд акридиновых красителей.

В 1971 году Yoshikawa (1971a), изучая механизм «излечивающего» действия акрифлавина на R^+ -штаммы *E. coli*, *Sh. flexneri* и *S. typhimurium*, пришел к выводу, что главным, если не единственным, механизмом элиминирующего действия акридинов является селективное увеличение в бактериальной популяции числа R^- -сегрегантов, которые возникают спонтанно.

В 1974 году Yoshikawa предложил метод скрининга, который можно применить для изыскания веществ, являющихся ингибиторами репликации R -факторов или (ii) подавляющих размножение бактериальных R^+ -штаммов. Основу метода составляет использование температурочувствительного *Hfr* штамма *E. coli*, полученного путем интегративной супрессии — дерепрессированного R -фактора. Рост этого штамма подавляется при «разрешенной и неразрешенной» температурах веществом — потенциальным ингибитором бактерий. В том же случае, когда испытуемый агент способен элиминировать R -фактор, рост штамма подавляется при «неразрешенной» температуре.

Недавно в лаборатории Йошикавы было установлено, что R^+ - и F^+ -клетки *E. coli* более чувствительны к действию касугамицина, чем штаммы, лишенные соответствующих эписом. На ранних стадиях роста R^+ -клеток в присутствии антибиотика для бактериальной популяции было характерным преобладание сегрегантов, однако затем начинало возрастать количество резистентных к действию касугамицина мутантов R^+ -клеток, что автор объясняет повышением уровня спонтанных мутаций. Таким образом, был установлен факт возникновения устойчивости R^+ -клеток к веществу, элиминирующему R -факторы. В связи с этим автор указывает на необходимость рационально применять препараты, обладающих способностью к преодолению устойчивости.

На возможность элиминирования эписомных факторов, в том числе детерминантов резистентности к лекарственным веществам с помощью акридиновых красителей, также указывают Somprolinsky et al. (1967), Grindley et al. (1970), Kontomichalou (1967) и др. Есть сообщения об аналогичной эффективности рифамицина (Johnston et al., 1970; Barzicalupo et al., 1972) и лимексина (Н. Т. Алексеевич и др., 1973).

Исключительный интерес представляют данные, полученные в лаборатории Mitsuhashi et al. (1974), о преимущественном действии некоторых антибиотиков на штаммы *E. coli*, в геном которых входят плазмиды R -факторов. В опыт были взяты два штамма: *E. coli* K12W 2241 $F-lac\ tat^+$ и *E. coli* K12W 2241R 100+ (устойчивый к тетрациклину, хлорамфениколу, стрептоми-

цину и сульфаниламидам), контролем служили те же штаммы, но лишенные плазмид. Испытывалось действие 14 антибиотиков: алтиомицина, азомицина, дауномицина, диумицина, гризеолу-теина А, лиомицина, касугамицина, митомицина С, неоплюрамицина, нетропсина, паносиамина, флеомицина, стрептотрицина А-249 и ксантомицина. Самой высокой избирательной активностью в отношении *E. coli* R^+ характеризовались митомицин С и гризеолутеин. Стрептотрицин, дауномицин и диумицин подавляли только рост клеток. Остальные изученные антибиотики проявляли незначительное подавляющее действие на оба штамма независимо от специфики эписомы. Проверка элиминирующего действия антибиотиков показала, что таким свойством обладал только митомицин С. Анализируя полученные результаты и данные, опубликованные другими исследователями, авторы делают заключение, что существует два вида элиминации плазмид: один — вследствие подавления репликации эписомной ДНК и другой — преимущественное угнетение роста бактериальных клеток — носителей плазмид, что приводит к отбору бактерий, спонтанно теряющих эписомные факторы.

О перспективах использования ДНК-тропных препаратов в клиниках для преодоления устойчивости бактерий к антибиотикам свидетельствуют приведенные в литературе результаты экспериментального изучения действия антимуагенов и элиминирующих агентов в опытах *in vivo*.

Например, Vouanchaud et al. (1971) ввел мышам гнотобионтам через рот $5 \cdot 10^7$ клеток *S. oranienburg* R^+ . По истечении 3 дней животным начали давать перорально 2 мг акрифлавина в день. В первый же день после приема красителя в выделенных из кала мышей сальмонеллах отмечалась элиминация детерминантов резистентности к стрептомицину, канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину и сульфаниламидам (с частотой до 96%), устойчивость к ампициллину у штамма сохранялась. Интересно добавить, что в опытах с другими видами сальмонелл (*S. paratyphi* и *S. paratyphi*) удавалось элиминировать и ампициллиноустойчивость.

В аналогичных опытах со *S. aureus* бактерии вводились мышам двумя путями: интравенозно и внутрибрюшинно. Элиминацию R -фактора наблюдали только при втором способе введения микробов. В качестве элиминирующего агента использовали бромистый этидий, вводимый *per os* (2,5; 10 и 20 мг) или внутрибрюшинно (от 0,03 до 0,25 мкг).

Севаг, де Курси (1970) получили хорошие результаты и в условиях клиники, применяя атебрин в сочетании с антибиотиками при лечении хронических инфекций экскреторных систем у детей.

Таким образом, большое количество литературных данных свидетельствует о возможности превращения устойчивых к антибиотикам микробных клеток в антибиотикочувствительные

с помощью ДНК
чески активных
шинство из при
тах *in vitro*. Еще
шинство эффек
токсичных, не
зучаемых в кли
рожным и не
преодоления
применения хи
в нашем обзор
или антимуаг
комплексное и
ДНК возбужд
защитой ДНК
анализ законо
ности ДНК-тр
числе и хими
 R -факторы аге
деживающий
которых состо
тогенных микр

Глава III

МЕ
РЕЗ
И

ПЕ
ПР
И
НА

Широко
(1944), пок
с пневмокок
ленных ис
трансформа
Уже рез
мация мож
и что эфф
с помощью
а) состоян
ДНК и в)
Ряд на
чению, чт
трансформ

с помощью ДНК-тропных химических соединений и биологически активных веществ. Необходимо подчеркнуть, что большинство из приведенных в этой главе данных получено в опытах *in vitro*. Еще раз уместно напомнить, что подавляющее большинство эффективных веществ относится к числу сравнительно токсичных, не нашедших применения или ограниченно используемых в клинике. Это обстоятельство заставляет быть осторожным и не делать далеко идущих выводов о возможности преодоления лекарственной устойчивости путем сочетанного применения химиотерапевтических средств с представленными в нашем обзоре препаратами, обладающими элиминирующей или антимутагенной активностью. Нет сомнения, однако, что комплексное изучение процессов повышения чувствительности ДНК возбудителя инфекции к антибиотикам с одновременной защитой ДНК тканей человека от их токсического действия, анализ закономерностей проявления антимутагенной эффективности ДНК-тропных препаратов и рациональный поиск (в том числе и химический синтез) высокоактивных элиминирующих R-факторы агентов в совокупности представляют весьма обнадеживающий путь в общем направлении исследований, цель которых состоит в преодолении лекарственной устойчивости патогенных микроорганизмов.

Глава III

МЕЖБАКТЕРИАЛЬНАЯ ПЕРЕДАЧА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ И ЕЕ ПОДАВЛЕНИЕ

ПЕРЕДАЧА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС

Широко известные эксперименты Avery, MacLeod, MacCarty (1944), показавших трансформирующую роль ДНК в опытах с пневмококками, послужили основой для проведения многочисленных исследований, посвященных изучению генетической трансформации бактерий.

Уже результаты первых опытов обнаружили, что трансформация может осуществляться не у всех видов микроорганизмов и что эффективность передачи трансформируемого признака с помощью ДНК зависит по крайней мере от трех факторов: а) состояния реципиента, б) особенностей трансформирующей ДНК и в) условий контакта ДНК и реципиента.

Ряд наблюдений различных исследователей привел к заключению, что способность реципиентных клеток воспринимать трансформирующую ДНК сохраняется непродолжительный от-

резок времени (5—15 мин) и зависит от фазы роста клеток. Состояние реципиента в этот период было названо компетентностью.

Изучая вопрос о возможности трансформации того или иного вида бактерий или анализируя влияние различных факторов на осуществление этого генетического процесса, целесообразно рассматривать трансформацию как процесс, состоящий из нескольких стадий.

Формальное распределение трансформации по фазам было сделано Хочкисом (1960). Он представил последовательность событий при трансформации следующим образом: 1) адсорбция трансформирующей ДНК на каком-то участке поверхности бактериальной клетки; 2) ее проникновение внутрь клетки; 3) ее специфическое спаривание (синапсис) с хромосомной структурой в одном из бактериальных ядер; 4) интеграция генетического фактора, внесенного в клетку с трансформирующей молекулой, в структуру хромосомной ДНК; процесс, обеспечивающий дупликацию этого фактора при каждом клеточном делении; 5) сегрегация трансформированного ядра в результате одного или двух митотических делений. Весь этот ряд процессов в конечном итоге ведет к появлению трансформанта, у которого новый фактор проявляется в фенотипе (фенотипическая экспрессия); однако, как полагает Шеффер (1960), физиологический феномен проявления отличается от всех остальных стадий тем, что для него нельзя отметить определенного места.

Первое сообщение о трансформации резистентности к сульфаниламидам появилось в 1941 году. С тех пор было опубликовано большое количество работ, в которых представлены данные о трансформации устойчивости не менее чем к десяти антибиотикам у различных видов микроорганизмов.

Ephrussi-Taylor (1961), Ravin (1961) и многие другие осуществили трансформацию устойчивости к стрептомицину, эритромицину, пенициллину и ванкомицину у пневмококков.

Voll, Goodgal (1961) и др. сообщили о передаче с помощью трансформации чувствительным клеткам *H. influenzae* резистентности к стрептомицину, канамицину, новоблоцину, виомицину и эритромицину. В опытах Harford et al. (1973, была продемонстрирована межвидовая трансформация рода *Bacillus*, при которой с помощью донорской ДНК реципиентные клетки приобретали устойчивость к рифампицину и эритромицину.

Трансформация устойчивости к стрептомицину была получена рядом исследователей у различных микроорганизмов, в том числе стафилококков, микобактерий, стрептококков, нейсерий, актиномицетов и других (И. М. Терешин, 1967).

Особо следует остановиться на трансформации микроорганизмов кишечной группы.

Первым видом бактерий, при использовании которого удалось подтвердить данные, полученные на пневмококках, о том,

что трансформация
кишечная группа
Boivin et al.
выделенная из
составу полисахаридов
базиллярности к репродукции
смерти Boivin
воспроизвести
В последующих
публикации о
В опытах
трансформирующей
лочки. Авторы
мации способ
Протопласты
при трансформации
Д. Г. Кудлай
ципиента. Кр
передача уст
осуществить
протопласты
воспроизведе
отмечено ин
цию протопла
Kimura (1961)
зистентности
О трансформации
группы при
peri; Goland
E. coli; T. H.
В то же время
веденных д
Например
бораториях
бактерий
произведе
результат
Противопоказ
лей на из
териальны
безусловно
уже дав
в област
ция). С
цедура
ДНК с
Трансформация

что трансформирующий фактор есть не что иное, как ДНК, была кишечная палочка.

Boivin et al. (1946) показали, что высокополимерная ДНК, выделенная из штамма *E. coli*, отличавшегося от реципиента по составу полисахаридов и ферментативным свойствам, при добавлении к реципиентному штамму вызывала его трансформацию в направлении указанных свойств. К сожалению, после смерти Boivin реципиентные штаммы *E. coli* были утеряны и воспроизвести полученные им результаты не удалось.

В последующие годы в литературе неоднократно появлялись публикации о трансформации бактерий кишечной группы.

В опытах Chargaff et al. (1957) источником и акцентором трансформирующей ДНК были протопласты кишечной палочки. Авторам удалось передать реципиенту путем трансформации способность синтезировать лизин.

Протопласты бактерий *S. typhimurium* были использованы при трансформации устойчивости к стрептомицину в опытах Д. Г. Кудлай и др. (1960, 1961) также в качестве донора и реципиента. Кроме опыта гомотрансформации, в котором удалась передача устойчивости к стрептомицину, была сделана попытка осуществить гетеротрансформацию, применив как реципиент протопласты *S. gallinarum*. В этом случае не только не была воспроизведена трансформация указанного признака, но было отмечено ингибирующее действие препарата ДНК на регенерацию протопластов.

Kimura (1956) утверждает, что получил трансформацию резистентности к стрептомицину на целых клетках *S. typhimurium*.

О трансформации различных видов бактерий кишечной группы приводят также данные Weil, Binder (1947) — *Sh. flexneri*; Goland et al. (1951) — *S. typhimurium*; Jannes (1962) — *E. coli*; Т. Н. Дехтяренко (1964) — *E. coli*.

В то же время существовало мнение, что некоторые из приведенных данных не всегда воспроизводятся.

Например, отмечено (А. А. Прозоров, 1966), что в двух лабораториях СССР с высоким уровнем исследований по генетике бактерий были получены отрицательные результаты при воспроизведении трансформации на кишечной палочке. Такой же результат получил ранее Ravin (1961).

Противоречивость данных обратила внимание исследователей на изыскание новых путей трансформации указанных бактериальных видов. Работы в этом направлении представлялись безусловно перспективными, так как бактерии кишечной группы уже давно стали излюбленной моделью для исследований в области генетики микроорганизмов (конъюгация, трансдукция). Сравнительно недавно описана модифицированная процедура трансформации, обеспечивающая введение плазмидной ДНК с высокой частотой в клетки *S. typhimurium* и *E. coli*. Трансформационные клетки приобрели также кольцевую ДНК

с генетическими (устойчивость к тетрациклину) и молекулярными свойствами трансформирующей плазмидной ДНК. Сходные результаты были отмечены при трансформации *S. aureus* с помощью ДНК плазмид — носителей генов устойчивости к эритромицину и пенициллину. Осуществлена передача *R*-фактора (Kan, Cm, Amp), выделенного из *R. aeruginosa*, клеткам *Rhizobium trifolii* в трансформационной системе, где в качестве трансформирующей ДНК были использованы изолированные *R*-факторы.

Таким образом, информация, которой располагают в настоящее время исследователи, позволяет сделать заключение об определенной взаимосвязанности двух процессов межклеточной передачи генетической информации: трансформации и эпизомного переноса. Пока эти данные получены в опытах, проведенных *in vitro*, но не исключено, что подобные результаты могут иметь место и в условиях организма.

При изучении трансформации было обнаружено, что этот генетический процесс не ограничен только сферой внутривидовых взаимоотношений бактерий, а может быть межвидовым, и даже межродовым.

О первом примере межвидовой трансформации сообщила Ballasa (1955), работая с клубеньковыми бактериями (*Rhizobium*).

Дальнейшие исследования в этом направлении проводились группой Rakula et al. (1958, 1963). Было выделено 13 штаммов (из 45 проверенных) *Str. viridans*, которые трансформировались ДНК, полученной из штаммов *Str. viridans*, *Str. salivaris*, *Str. sanguinis*, *Str. haemolyticus* и *Str. faecalis*, устойчивых к стрептомицину. Межродовая трансформация была установлена в опытах, когда реципиентом служили пневмококки, а трансформирующую ДНК выделяли из различных видов стрептококков. Более того, наблюдалось, что пневмококковая ДНК трансформировала *Str. viridans* и *Str. haemolyticus*. Perry, Slade (1962) опубликовали результаты, приблизительно соответствующие данным Rakula. Трансформация устойчивости к стрептомицину наблюдалась у стрептококков группы F, H, O и серологически неклассифицируемых штаммов, которые трансформировались ДНК из группы A, C, G и H.

Большое внимание привлекают данные о возможности трансформации устойчивости к нескольким антибиотикам. Известно, что если для получения трансформирующей ДНК используется донор — носитель генетически несцепленных маркеров, то признаки при трансформации передаются реципиенту независимо друг от друга, и трансформанты, измененные сразу по двум признакам, появляются с частотой, равной вероятности совпадения двух независимых событий. В случае же, если генетические маркеры сцеплены, частота возникновения двойных трансформантов гораздо выше и значительно превышает вероятность совпадения двух независимых событий.

Примером
формация уст
fluensae, опи
Следует о
одномоментн
сцепления ма
формация уст
Исключи
ния фактор
терий, а та
биотикам ф
формации
цесса.

Мы не
эксперимент
формации в
ченных в ср

Такака
трансформа
лость белых
нагреванием
личных усл
что пригото
полость на
воде и мяс
же время
мантов при
10,0. Показ
отношения
торой полу

Установ
мицину пн
осуществл
тогда Гриф
рующего
В своих
шинно, а
трансфор
формации
роятно, и

Ottole
заражени
кокков: д
реципиен
место фе
Трансфо
клеток п
к вывод

3 и м т

Примером передачи сцепленных маркеров является трансформация устойчивости к стрептомицину и катомоцину у *H. influenzae*, описанная Goodgal (1961).

Следует отметить, что обычно трансформация устойчивости одновременно к нескольким антибиотикам, вне зависимости от сцепления маркеров, происходит с меньшей частотой, чем трансформация устойчивости к отдельным антибиотикам.

Исключительно важное практическое значение для выяснения факторов эволюции, видообразования, изменчивости бактерий, а также причин распространения устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов представляют данные о трансформации *in vivo* и возможных механизмах этого процесса.

Мы не будем останавливаться на хорошо известных экспериментах Griffith (1928), первым получившим факт трансформации в организме, а ограничимся обзором данных, полученных в сравнительно недавнее время.

Tanaka (1958), по существу повторив опыт Гриффитса по трансформации пневмококков путем введения в брюшную полость белых мышей живых бактерий штамма типа IIR и убитых нагреванием клеток типа IIIS, провел изучение влияния различных условий на эффективность трансформации. Он показал, что приготовление взвеси бактерий для введения в брюшную полость на физиологическом растворе, а не в дистиллированной воде и мясном бульоне снижало число трансформантов. В то же время не наблюдалось изменений в количестве трансформантов при колебаниях pH в бульоне (для взвеси) от 4,0 до 10,0. Показано значение для трансформации определенного соотношения клеток донора и реципиента и температуры, при которой получают убитые клетки.

Установлено, что трансформация чувствительных к стрептомицину пневмококков в устойчивые *in vivo* может быть успешно осуществлена не только при использовании классического метода Гриффитса, но и при раздельном введении трансформирующего фактора или лизата клеток, содержащего ДНК. В своих экспериментах они вводили реципиент внутрибрюшинно, а ДНК подкожно и получали определенное количество трансформантов. Наблюдалось, что для более успешной трансформации необходима ДНК, связанная с белком, который, вероятно, имеет значение для стабилизации ДНК.

Ottolenghi et al. (1963) сообщают, что при одновременном заражении мышей внутрибрюшинно двумя культурами пневмококков: донором, устойчивым к стрептомицину, и компетентным реципиентом, чувствительным к названному антибиотику, имел место феномен трансформации устойчивости к стрептомицину. Трансформации не отмечалось в том случае, если к суспензии клеток перед заражением добавляли ДНК-азу. Авторы приходят к выводу о существовании трансформации при участии ДНК

в генетически смешанных популяциях пневмококков в организме живых мышей.

О фактах трансформации *in vivo* приводят данные Balassa (1955) и Wacker (1960).

Некоторое представление о возможных механизмах генетической трансформации в организме животных дают результаты, полученные в лабораториях Хочкисса и Catlin.

Хочкиссом (1961) было обнаружено, что нормально растущие культуры пневмококков содержат внеклеточную трансформирующую ДНК. Наивысшая активность этой ДНК проявляется в заключительной стадии фазы логарифмического роста и фактически совпадает с периодом максимальной способности (компетентности) клеток к трансформации. Количество выделяемой бактериями ДНК составляет приблизительно 0,1% от количества, необходимого для максимальной трансформации при обычных условиях.

Тем не менее этого может быть достаточно, чтобы вызвать трансформацию у 1% присутствующих в культуре жизнеспособных микробов.

Интересно, что число живых клеток при накоплении экстрацеллюлярной ДНК не уменьшалось.

Catlin осуществил трансформацию устойчивости к стрептомицину и эритромицину у *N. meningitidis* с помощью ДНК, выделенной из слизи, появляющейся в культуре в процессе ее старения, а также и при использовании неочищенной слизи.

Накопление внеклеточной трансформирующей ДНК в культурах *Bac. subtilis* также наблюдали Takahashi, Gibbons (1962).

В отличие от Хочкисса как Takahashi, так и Catlin объясняли накопление внеклеточного дезоксирибонуклеата гибелью и лизисом части микробной популяции; Catlin также предполагал, что при таких трансформациях существенную роль играет внеклеточная РНК как ингибитор ДНК-азы.

Аналогичные данные о накоплении в культурах различных микроорганизмов ДНК, способной трансформировать компетентные реципиентные клетки, были получены Mauzy et al. (1955) в опытах с бруцеллами, Catlin (1956) — у пневмококков.

Большинство из названных исследователей приходит к заключению, что трансформация, по всей вероятности, является естественным, встречающимся в природе механизмом генетической рекомбинации для некоторых бактериальных видов.

Из антибиотиков, которые известны как нетоксичные для организма, наиболее часто для изучения трансформации применялся хлорамфеникол. Этот антибиотик, характерным свойством которого является специфическое подавление синтеза белка в бактериальных клетках, использовался главным образом с целью выяснения биохимических механизмов отдельных стадий трансформации.

Об угнетении процессов трансформации в присутствии хлорамфеникола имеются данные, полученные в опытах с пневмококками, *N. meningitidis* и другими стрептококками, *Bac. subtilis*, *H. influenzae*.

Таким образом, в настоящее время известно, что на эффективность генетической трансформации существенное влияние оказывают различные факторы, важнейшими из которых являются физиологическое состояние реципиентной клетки, свойства трансформирующей ДНК и условия контакта реципиента и ДНК донора. Значение названных факторов может зависеть от мало-заметных особенностей используемого штамма, метода работы и составных элементов питательной среды. Трансформация устойчивости к различным антибиотикам, а в некоторых случаях и к их сочетаниям, в опытах *in vitro* осуществлена свыше чем на 20 видах микроорганизмов, при этом она может быть межвидовой и межродовой. Большой интерес представляет изучение возможности трансформации бактерий кишечной группы и особенно тех видов, которые способны передавать свой генетический материал путем конъюгации или трансдукции. Данные литературы по этому вопросу весьма противоречивы. Большое значение имеют результаты изучения трансформации в организме животных. Однако еще недостаточно исследованы особенности ее протекания в условиях организма по сравнению с этим процессом в пробирочных опытах.

Возможность осуществления трансформации *in vivo* у различных видов бактерий, главным образом патогенных, позволяет предположить, что трансформация может быть одним из путей возникновения и распространения антибиотикоустойчивых форм бактерий. В связи с этим представляется практически важным изучить действие на трансформацию устойчивости к антибиотикам различных лекарственных средств, в том числе и антибиотиков, с целью изыскания препаратов, подавляющих этот генетический процесс.

Исходя из состояния проблемы генетической трансформации, автором с сотрудниками был намечен ряд задач, связанных с трансформацией устойчивости бактерий к антибиотикам:

1. Трансформация устойчивости к стрептомицину и к эритромицину у гемолитических стрептококков *in vitro*.
2. Межвидовая трансформация устойчивости к стрептомицину у стрептококков.
3. Трансформация устойчивости к стрептомицину у стрептококков в организме животных.
4. Действие некоторых антибиотиков на трансформацию устойчивости к стрептомицину у стрептококков *in vitro* и *in vivo*.

В опытах использовали следующие два штамма бактерий: *Str. haemolyticus* (Challis) Sm^r , Ery^r , Can^r , донор, из которого по методу Margit выделяли трансформирующую ДНК; *Str.*

haemolyticus (Challis) — Sm^s, Ery^r, Can^s, этот штамм во всех опытах по трансформации служил реципиентом.

Трансформацию устойчивости к стрептомицину осуществляли по методу Rakula et al. (1963).

Подобранные оптимальные условия для трансформации гемолитического стрептококка в опытах *in vitro* были следующие: развитие компетентности в течение 150 мин в присутствии свиной сыворотки при концентрации инокулюма в пределах $10-80 \cdot 10^4$ клеток/мл и добавление трансформирующей ДНК в концентрации 5 мкг/мл.

ТАБЛИЦА

Сравнительная эффективность трансформации устойчивости к стрептомицину, эритромицину и стрептомицину + эритромицину у *Streptococcus haemolyticus*

Антибиотик	№ опыта	Количество клеток реципиента в 1 мл	Количество клеток трансформантов в 1 мл	% трансформантов
Стрептомицин . . .	1	$457 \cdot 10^4$	$450 \cdot 10^2$	0,9
	2	$461 \cdot 10^4$	$402 \cdot 10^2$	0,85
	3	$552 \cdot 10^4$	$486 \cdot 10^2$	0,85
Эритромицин	1	$457 \cdot 10^4$	$131 \cdot 10^2$	0,25
	2	$461 \cdot 10^4$	$140 \cdot 10^2$	0,3
	3	$552 \cdot 10^4$	$171 \cdot 10^2$	0,3
Стрептомицин + эритромицин	1	$457 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^2$	0,004
	2	$461 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$	0,003
	3	$552 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^2$	0,004

В табл. 1 приведены результаты изучения внутривидовой трансформации устойчивости к стрептомицину, эритромицину и к сочетанию этих антибиотиков у гемолитического стрептококка. Как показывают представленные данные, устойчивость к эритромицину трансформируется менее эффективно, чем устойчивость к стрептомицину. Если в описываемых опытах число стрептомицинорезистентных трансформантов было в пределах 0,85—0,9%, то приобретение устойчивости к эритромицину в результате трансформации удавалось наблюдать только у 0,25—0,3% реципиентных стрептококков. Как и следовало ожидать, ввиду несцепленности исследуемых генетических маркеров очень малой оказалась трансформация устойчивости одновременно к эритромицину и стрептомицину: количество обнаруженных трансформантов составляло всего 0,003—0,004% клеток компетентной популяции реципиента, т. е. было в 100—200 раз меньше, чем при трансформации по одному генетическому мар-

керу. Тем не менее следует отметить, что, несмотря на такой малый процент трансформаций, этот генетический процесс мог бы занять определенное место среди причин возникновения бактерий, резистентных к ряду антибиотиков, с учетом селективного действия последних.

Раздел исследований, посвященный изучению межвидовой и межродовой трансформации устойчивости к стрептомицину, представляет интерес с той точки зрения, что межвидовая и межродовая трансформация являются одним из самых доказательных фактов, свидетельствующих в пользу возможного участия этого генетического процесса в возникновении и распространении антибиотикоустойчивых форм бактерий, так как в этом случае передача резистентности путем трансформации обуславливает появление в организме в отсутствие какого-либо антибиотика устойчивых бактериальных клеток того вида микроорганизмов (возможно, более патогенного, чем вид донора), все представители которого до трансформации были чувствительными к данному антибиотику.

Во всех опытах по межвидовой и межродовой трансформации в качестве реципиента использовали компетентные клетки штамма *Str. haemolyticus* Sm^s, Ery^s Can^s. ДНК по методу Margitg выделяли (как из гемолитических стрептококков) из клеток следующих бактериальных видов:

- | | |
|---|---------------|
| 1) <i>Str. sanguis</i> Sm ^r | 1 500 мкг/мл |
| 2) <i>Str. faecalis</i> Sr ^r | 4 000 мкг/мл |
| 3) <i>Str. mitis</i> Sm ^r | 4 000 мкг/мл |
| 4) <i>N. pneumoniae</i> Sm ^r | 10 000 мкг/мл |
| 5) <i>S. albus</i> Sm ^r | 2 000 мкг/мл |

которые служили донором.

Сравнивая эффективность трансформации в зависимости от видовой принадлежности ДНК, принимали за 100% количество трансформантов, образующихся при внутривидовой трансформации (донор и реципиент, штаммы *Str. haemolyticus* Challis).

В табл. 2 приводятся результаты проведенных опытов. Они показывают, что относительно более эффективной была трансформация в опытах, где применялась трансформирующая ДНК, из бактерий *Str. sanguis*; число трансформантов в этом случае лишь на 20% отличалось от такового, получаемого при внутривидовой трансформации. Этот факт не представляется удивительным, если учитывать сходство по видовым характеристикам штаммов донора и реципиента. Гораздо меньшая эффективность трансформации (4%) была в экспериментах с другим видом стрептококков — *Str. mitis*. Что касается результатов использования в качестве доноров представителей других родов бактерий (пневмококков, стафилококков и энтерококков), то они показывают, что самая высокая эффективность (1%) имела место при межродовой трансформации стрептококков и

пневмококков. ДНК остальных изученных родов трансформировала стрептококки с относительно небольшой эффективностью (0,2—0,04%).

Основой для суждения об участии трансформации микроорганизмов в возникновении и распространении устойчивых к антибиотикам бактерий является выяснение возможности осуществления этого генетического процесса в условиях организма животных.

До настоящего времени оставалось неизвестным, имеются ли какие-либо особенности у трансформации *in vivo* по сравнению с протеканием этого процесса *in vitro*. В связи с этим мы изу-

ТАБЛИЦА 2

Межвидовая передача устойчивости к стрептомицину при трансформации *in vitro*

Штамм реципиента	Штамм донор	Количество трансформантов в 1 мл	Эффективность трансформации в %
Streptococcus haemolyticus (Challis)	Str. haemolyticus	500·10 ⁴	100
	Str. sanguis	400·10 ⁴	80
	Enterococcus	38·10 ²	0,04
	Str. mitis	200·10 ³	4
	Pneumococcus	50·10 ³	1
	S. albus	137·10 ²	0,2

чили на хорошо трансформируемой бактериальной модели — гемолитическом стрептококке — развитие компетентности реципиента и фенотипической экспрессии маркера устойчивости к стрептомицину, а также роль различных факторов и условий (концентрация белка в препарате ДНК, методы введения ДНК и реципиента и др.) в эффективной передаче стрептомициноустойчивости *in vivo* посредством трансформации.

В этих опытах реципиентом служили стрептококки штамма Str. haemolyticus Sm^s (Challis). Трансформирующая ДНК выделялась из донорских клеток штамма Str. haemolyticus Sm^r (Challis) по методу Magnum. Опыты были проведены на белых мышах.

Сначала выяснили возможность трансформации в организме белых мышей при одновременном введении трансформирующей ДНК и реципиентных клеток различными путями, а именно: внутрибрюшинным, внутривенным, пероральным и подкожным.

При исследовании возможности трансформации стрептококков в кровяном русле 0,5 мл культуры реципиента и 0,1 мл раствора ДНК вводились внутривенно. Следует отметить, что в результате введения ДНК у мышей наблюдали выраженное шоковое состояние, избавиться от которого их удавалось в большинстве случаев, применяя искусственное дыхание и тщатель-

ный массаж грудной области. Через 2 ч мышей усыпляли и для выявления трансформантов высевали кровь и гомогенаты почек, печени и селезенки.

При подкожном введении компетентных клеток реципиента (1 мл культуры) и трансформирующей ДНК (0,1 мл раствора) трансформанты обнаруживали путем посева смыва (1 мл физиологического раствора) подкожной области в месте инъекции.

Результаты попыток передачи устойчивости к стрептомицину у стрептококков при различных путях одновременного попадания трансформирующей ДНК и реципиентных клеток в организм белых мышей показали, что исследуемый вид бактерий не подвергается внутривидовой трансформации в условиях кровотока и пищеварительного тракта белых мышей. Во всех проведенных экспериментах были получены отрицательные результаты: колоний трансформантов на кровяном агаре со стрептомицином не выросло. В то же время контакт компетентных стрептококков с трансформирующей ДНК в брюшной полости и подкожной клетчатке приводил к появлению устойчивых к стрептомицину стрептококков, что означало осуществление процесса трансформации. В посевах из внутрибрюшинной жидкости удавалось обнаружить $100-200 \cdot 10^3$ трансформантов, при этом частота трансформации на 1 клетку реципиента составляла $48 \cdot 10^{-6}$. Реже происходила трансформация при введении ДНК и реципиента подкожно: в этом случае трансформантов было в среднем в 100—120 раз меньше, чем при посевах из брюшной полости; соответственно частота трансформации также снижалась.

Было установлено, что довольно выраженное подавление трансформирующей активности ДНК (или способности донора трансформироваться) наблюдается при 65-процентном содержании белка в дезоксирибонуклеопротенде: в этих опытах число трансформантов снижалось в 5—6 раз.

Таким образом, была показана возможность передачи устойчивости к стрептомицину при трансформации гемолитического стрептококка *in vivo*. Особенно эффективно этот генетический процесс проходил в брюшной полости при одновременном введении $30 \cdot 10^5$ реципиентных клеток с 50—100 мкг ДНК при условии, что количество примеси белка в препарате трансформирующей ДНК не превышало 25%. Необходимо отметить, что все проведенные контрольные опыты подтверждали действительное появление трансформантов в описанных условиях.

Однако на основании полученных данных еще недостаточно ясно, могут ли возникающие трансформанты из брюшной полости попадать в кровь и вместе с нею распространяться по различным жизненно важным органам, т. е. принимать активное участие в патогенезе инфекции. Внести некоторую ясность в этот вопрос могло бы изучение распространения трансформантов в организме белых мышей при трансформации стрептококков

в брюшной полости. С этой целью через 24 ч после одновременного введения реципиента и трансформирующей ДНК определяли количество стрептококков, устойчивых к стрептомицину, в крови, гомогенатах почек и селезенки и смыве с брюшины.

Результаты высевок из полученных гомогенатов приводятся в табл. 3. Они показывают, что стрептомициноустойчивые стрептококки, возникшие в результате генетической трансформации в брюшной полости, не остаются в месте своего образования, а довольно активно распространяются по всему организму животного. Так, например, через 24 ч после начала трансформации в селезенке обнаруживали трансформантов в 20 раз больше, чем в смыве с брюшины. В крови резистентные к стреп-

ТАБЛИЦА 3

Распределение трансформантов в некоторых органах и крови белых мышей при трансформации в брюшной полости

Органы, из которых высеивались трансформанты	Количество трансформантов в 1 мл
Селезенка	$202 \cdot 10^2$
Смыв с брюшины	$12 \cdot 10^2$
Почки	$4 \cdot 10^2$
Кровь	$5 \cdot 10^1$

томицину стрептококки определялись в сравнительно небольшом количестве: 50 клеток в 1 мл; несколько больше трансформантов было в почках: 400 клеток в мл.

Эти данные дают основание говорить, что, несмотря на то, что трансформация не происходит в кровяных сосудах или кишечнике, осуществление передачи устойчивости к стреп-

птомицину с помощью этого генетического процесса в других частях организма, в частности в брюшной полости, не исключает возможность широкого обсеменения резистентной к антибиотикам микрофлорой различных органов животного.

При анализе изложенных выше результатов вполне справедливо может возникнуть вопрос: возможно ли появление компетентных клеток реципиента в условиях организма животного, например в брюшной полости?

Получение ответа на этот вопрос необходимо, так как только при развитии компетентности процесс трансформации *in vivo* приобретает практическую значимость.

В этой связи интересно было выяснить экспериментально, возникают ли компетентные клетки в брюшной полости подопытных животных и, если возникают, то не имеется ли каких-либо особенностей у этого процесса по сравнению с развитием компетентности *in vitro*.

Были проведены следующие исследования: в брюшную полость белым мышам вводили культуру реципиентного штамма. После введения реципиента через различные сроки внутрибрюшинно вводили раствор ДНК. Через 2 ч с момента введения трансформирующей ДНК определяли число трансформантов во внутрибрюшинной жидкости.

Во второй серии опытов была поставлена задача исследовать необходимость присутствия сыворотки для развития компетентности. В этом случае эксперименты ставили аналогично вышеописанным, только во вводимую культуру реципиента не добавляли свиную сыворотку.

На рис. 1 показано, как происходило образование компетентных клеток в брюшной полости белых мышей с добавлением сыворотки и без нее. Для сравнения приведены данные аналогичных исследований развития компетентности *in vitro*.

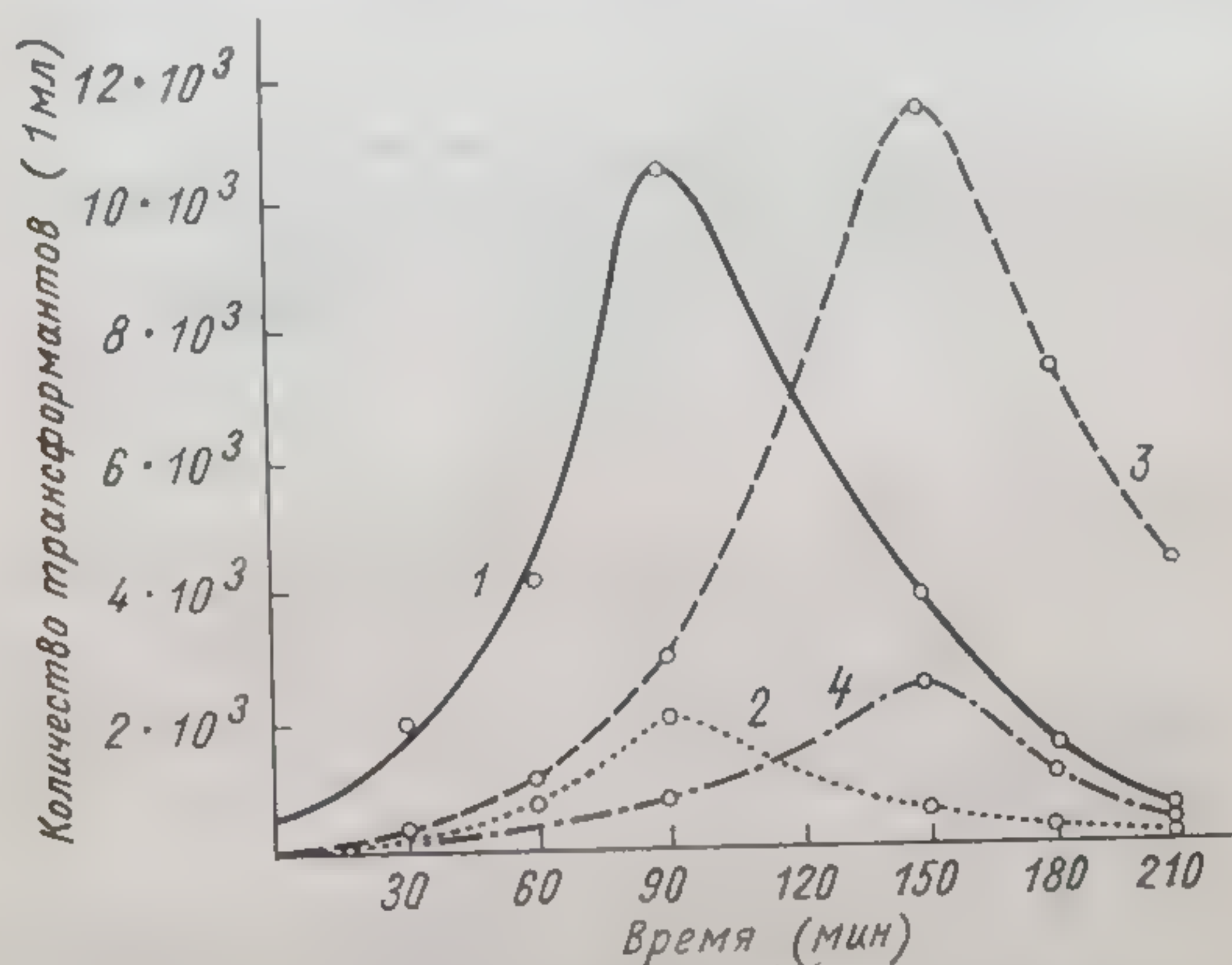


Рис. 1. Развитие компетентности гемолитического стрептококка в брюшной полости и *in vitro*.

1 — с сывороткой крови *in vivo*; 2 — без сыворотки *in vivo*; 3 — с сывороткой крови *in vitro*; 4 — без сыворотки *in vitro*.

Какие выводы можно сделать из графиков, изображенных на рисунке?

1. Развитие компетентности стрептококков может происходить в условиях брюшной полости белых мышей.

2. Динамика нарастания числа компетентных клеток *in vivo* отличается от такового процесса *in vitro*. Максимальное количество бактерий, способных воспринимать трансформирующую ДНК, образуется в брюшной полости животного уже через 90 мин после введения в нее некомпетентной культуры, в то время как в условиях *in vitro* максимум компетентности отмечается только на 150-й минуте культивирования.

3. Способность стрептококков к трансформации может развиваться и в отсутствие сыворотки как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. Время максимальной компетентности бактериальной популяции при этом такое же, как и в опытах с добавлением сыворотки. Однако количество трансформантов в этом случае

обычно в 5—6 раз меньше. «Сывороточный эффект» был приблизительно одинаковым в опытах в организме животного и в пробирке.

В противоположность стадии развития компетентности конечная фаза трансформации — фенотипическая экспрессия — не имела какой-либо специфики, связанной с условиями организма животного. Таким образом, наши данные показывают, что гемолитический стрептококк может становиться компетентным и приобретать устойчивость к стрептомицину в результате трансформации *in vivo*.

ТАБЛИЦА 4

Действие тетрациклина, эритромицина, хлорамфеникола, пенициллина и полимиксина на развитие компетентности реципиентных клеток *Streptococcus haemolyticus in vitro*

Антибиотик	Контроль			Опыт			Подавление
	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформации	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформации	
Тетрациклин	$890 \cdot 10^5$	$720 \cdot 10^2$	$81 \cdot 10^{-5}$	$782 \cdot 10^5$	$691 \cdot 10^2$	$88 \cdot 10^{-5}$	Не подавляет В 69 раз Полностью Не подавляет То же
Пенициллин	$740 \cdot 10^5$	$610 \cdot 10^1$	$82 \cdot 10^{-6}$	$250 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^1$	$12 \cdot 10^{-7}$	
Хлорамфеникол	$740 \cdot 10^5$	$610 \cdot 10^1$	$82 \cdot 10^{-6}$	$360 \cdot 10^5$	0	0	
Полимиксин	$890 \cdot 10^5$	$726 \cdot 10^2$	$81 \cdot 10^{-5}$	$754 \cdot 10^5$	$685 \cdot 10^2$	$81 \cdot 10^{-5}$	
Эритромицин	$890 \cdot 10^5$	$726 \cdot 10^2$	$81 \cdot 10^{-5}$	$710 \cdot 10^5$	$515 \cdot 10^2$	$72 \cdot 10^{-5}$	

Идея использования антибиотиков в качестве средства, предотвращающего возникновение и распространение резистентных к иным антибиотикам бактерий, не нова. Наибольшее свое развитие она получила в применении сочетаний различных антибиотических препаратов. Однако до настоящего времени нельзя с достаточной определенностью сказать, каков механизм взаимодействия антибиотиков в том или ином сочетании. Не исключено, что одной из причин синергизма некоторых антибиотиков является их влияние на генетические процессы, которые, как было показано в предыдущих опытах, могут служить источниками появления антибиотикоустойчивых штаммов.

Эти соображения побудили нас выяснить, какое действие оказывают на процесс переноса устойчивости при трансформации некоторые из применяемых в медицинской практике антибиотиков. Получение результатов в этом направлении представлялось интересным с точки зрения изыскания препаратов, подавляющих возможное распространение резистентности, а также и в теоретическом аспекте, так как использование антибиотиков с известным механизмом действия позволяет судить о роли тех

или иных синтетических процессов бактериальной клетки в передаче устойчивости к антибиотикам с помощью генетической трансформации.

В опытах изучали действие тетрациклина, полимиксина, эритромицина, пенициллина и хлорамфеникола на различные стадии трансформации устойчивости к стрептомицину у *Str. haemolyticus* (Challis).

В табл. 4 приводятся данные экспериментов, в которых изучалось влияние антибиотиков на развитие компетентности. В этих опытах препараты в концентрациях, не подавляющих роста стрептококков, добавляли в среду одновременно с засевом некомпетентной культуры реципиентных клеток и через 2,5 ч роста определяли степень компетентности стрептококков.

ТАБЛИЦА 5

Действие тетрациклина, эритромицина, хлорамфеникола, пенициллина и полимиксина на взаимодействие реципиентных клеток *Streptococcus haemolyticus* и трансформирующей ДНК *in vitro*

Антибиотик	Контроль			Опыт			Подавление
	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформации	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформации	
Тетрациклин	$735 \cdot 10^5$	$280 \cdot 10^2$	$38 \cdot 10^{-5}$	$592 \cdot 10^5$	$290 \cdot 10^2$	$49 \cdot 10^{-5}$	Не подавляет
Пенициллин	$780 \cdot 10^5$	$525 \cdot 10^2$	$67 \cdot 10^{-5}$	$177 \cdot 10^5$	$42 \cdot 10^2$	$24 \cdot 10^{-5}$	В 2,8 раза
Хлорамфеникол	$320 \cdot 10^5$	$525 \cdot 10^2$	$16 \cdot 10^{-4}$	$168 \cdot 10^5$	$138 \cdot 10^2$	$82 \cdot 10^{-5}$	В 2 раза
Полимиксин	$564 \cdot 10^5$	$463 \cdot 10^2$	$82 \cdot 10^{-5}$	$318 \cdot 10^5$	$408 \cdot 10^2$	$18 \cdot 10^{-4}$	Не подавляет
Эритромицин	$780 \cdot 10^5$	$525 \cdot 10^2$	$67 \cdot 10^{-5}$	$225 \cdot 10^5$	$286 \cdot 10^2$	$13 \cdot 10^{-4}$	То же

Как показывает таблица, из пяти изученных антибиотиков только два, пенициллин и хлорамфеникол, в значительной степени ингибировали приобретение клетками способности к трансформации. Особенно показательным было действие хлорамфеникола, который полностью предотвращал появление компетентных клеток. Несколько более слабым, но тем не менее весьма существенным был угнетающий эффект пенициллина, снижающего количество компетентных стрептококков в среднем в 69 раз.

Говоря о действии на развитие компетентности других исследуемых антибиотиков, надо отметить, что тетрациклин и полимиксин практически не оказывали никакого влияния на изучаемый процесс. Также очень малая активность препарата имела место в опытах с эритромицином.

Интересно было выяснить, как действуют те же самые антибиотики на осуществление стадий взаимодействия трансформи-

рующей ДНК с реципиентом и фенотипической экспрессии при передаче устойчивости к стрептомицину путем трансформации. В соответствии с поставленной задачей добавляли антибиотики в суббактериостатических концентрациях к компетентным бактериям одновременно с ДНК донора или (при изучении фенотипической экспрессии) с ДНК-азой.

Следует отметить, что для того, чтобы ограничить действие антибиотика периодом той или иной изучаемой стадии трансформации, тест-культуры после контакта с антибиотиком центрифугировались и полученный бактериальный осадок суспендировался в свежей питательной среде.

ТАБЛИЦА 6

Действие тетрациклина, эритромицина, хлорамфеникола, пенициллина и полимиксина на фенотипическую экспрессию трансформантов *Streptococcus haemolyticus in vitro*

Антибиотик	Контроль			Опыт			Подавление
	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформаций	Число живых клеток в 1 мл	Число трансформантов в 1 мл	Частота трансформаций	
Тетрациклин	$230 \cdot 10^5$	$119 \cdot 10^2$	$52 \cdot 10^{-5}$	$408 \cdot 10^5$	$107 \cdot 10^2$	$26 \cdot 10^{-5}$	В 2 раза
Пенициллин	$123 \cdot 10^6$	$183 \cdot 10^2$	$15 \cdot 10^{-5}$	$356 \cdot 10^5$	$216 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^{-5}$	В 2,5 раза
Хлорамфеникол	$123 \cdot 10^6$	$183 \cdot 10^2$	$15 \cdot 10^{-5}$	$128 \cdot 10^6$	$190 \cdot 10^2$	$16 \cdot 10^{-5}$	В 2,8 раза
Полимиксин	$560 \cdot 10^5$	$373 \cdot 10^2$	$66 \cdot 10^{-5}$	$290 \cdot 10^5$	$348 \cdot 10^1$	$12 \cdot 10^{-5}$	Не подавляет
Эритромицин	$560 \cdot 10^5$	$373 \cdot 10^2$	$66 \cdot 10^{-5}$	$264 \cdot 10^5$	$400 \cdot 10^1$	$15 \cdot 10^{-5}$	В 5,5 раза
							В 4,4 раза

Данные табл. 5 свидетельствуют, что компетентные клетки в стадии проникновения трансформирующей ДНК менее чувствительны к действию ингибиторов роста, чем в период развития компетентности. Пенициллин подавлял эту фазу в 2,8 раза, хлорамфеникол — в 2 раза, а тетрациклин, полимиксин и эритромицин вообще не проявляли в этом случае угнетающего действия. Последние два антибиотика, напротив, даже оказались некоторыми стимуляторами исследуемого генетического процесса.

Что касается стадии фенотипической экспрессии (табл. 6), то здесь можно говорить как о совершенно неэффективных в данных условиях препаратах о хлорамфениколе, полимиксине и эритромицине. Вместе с тем тетрациклин на этой стадии проявил довольно высокую активность, подавляя фенотипическую экспрессию в среднем в 2 раза. Как и в предыдущих опытах, весьма высокой эффективностью характеризовался пенициллин: его присутствие снижало частоту трансформации в представленном в таблице опыте в 2,5 раза. Таким образом, из совокупности

данных, полученных при изучении действия антибиотиков на различные стадии трансформации, можно сделать вывод, что относительно более эффективными, с этой точки зрения, в опытах *in vitro* являются пенициллин и хлорамфеникол.

В связи с этим последующие опыты были посвящены изучению действия указанных двух антибиотиков на трансформацию устойчивости к стрептомицину в брюшной полости белых мышей.

Эти опыты проводили следующим образом: в брюшную полость животных одновременно вводились 0,9 мл компетентной культуры реципиента ($40-60 \cdot 10^5$ клеток), 0,1 мл раствора ДНК (100 мкг) и 0,1 мл раствора антибиотика в соответствующем количестве. Контролем служили опыты с аналогичной

ТАБЛИЦА 7

Действие пенициллина и хлорамфеникола на трансформацию гемолитического стрептококка *in vivo*

Антибиотик	Концентрация антибиотика в мкг на 1 г живого веса	Степень подавления	Частота трансформации
Пенициллин	0,05	В 4,8 раза	$14 \cdot 10^{-7}$
Хлорамфеникол	1,0	В 7,5 »	$88 \cdot 10^{-8}$
Контроль	—		$67 \cdot 10^{-7}$

трансформацией *in vivo*, но без добавления антибиотиков. Через 2 ч после введения культуры реципиента и растворов ДНК и антибиотика мышам усыпляли, вскрывали и трансформанты подсчитывались путем высева на кровяной агар со стрептомицином. Из табл. 7 видно, что пенициллин и хлорамфеникол сохранили присущие им, по данным опытов *in vitro*, анитрансформационные свойства и в условиях организма животного. Например, пенициллин в концентрации 0,05 мкг на 1 г живого веса снижал число трансформантов и соответственно частоту трансформации в 4,8 раза, хлорамфеникол, правда в более высокой концентрации — 1,0 мкг на 1 г живого веса, подавлял процесс трансформации в брюшной полости в 7,5 раза.

Таким образом, было установлено, что передача устойчивости к стрептомицину путем трансформации представляет собой процесс, чувствительный к действию некоторых антибиотиков, главным образом пенициллина и хлорамфеникола.

Эти препараты могут с высокой эффективностью подавлять трансформацию гемолитических стрептококков в устойчивые к стрептомицину как *in vitro*, так и *in vivo*, что исключает или в значительной степени снижает участие указанного генетического процесса в распространении антибиотикоустойчивых вариантов бактерий.

Рассматривая трансформацию как один из путей возникновения и распространения антибиотикоустойчивых вариантов, представляется интересной аналогия между полученными данными и некоторыми явлениями, имеющими место при антибиотикотерапии. Например, известно, что устойчивость бактерий к стрептомицину развивается, как правило, во много раз быстрее, чем устойчивость к эритромицину (М. Н. Лебедева и др., 1960). С другой стороны, считается установленным фактом более медленное возникновение резистентности микроорганизмов к сочетанию антибиотиков, чем к отдельным препаратам, составляющим сочетание (В. А. Цыганов, 1964). Конечно, было бы преждевременным и недостаточно обоснованным объяснение названных явлений воздействием только на трансформацию, но кажется вполне вероятной мысль, что процессам межклеточного обмена генетической информацией путем трансформации принадлежит определенная роль в механизмах возникновения бактериальной клетки, устойчивой к нескольким антибиотикам.

Данные о межвидовой и межродовой трансформации бактерий особенно интересны в аспекте установления причин возникновения резистентных форм. Действительно, в условиях клиники иногда приходится сталкиваться с фактами, когда при суперинфекции организма чувствительным к тому или иному антибиотику возбудителем последний внезапно становится антибиотикорезистентным, причем, это превращение происходит при отсутствии лечения антибиотиками, и, что наиболее интересно, возбудитель вторичной инфекции становится устойчивым к тому антибиотику, к которому была выявлена резистентность у возбудителя первичной инфекции (Шнитцер, Грюнберг, 1960).

Эти факты трудно трактовать, если не принимать во внимание возможность межвидовой или межродовой передачи генетического материала между возбудителями первичных и вторичных инфекций.

К сожалению, мы не располагаем данными о межвидовой трансформации бактерий в организме животных. Однако результаты опытов *in vitro* убедительно свидетельствуют о передаче устойчивости к стрептомицину путем трансформации от стафилококков и пневмококков стрептококкам. Оценивая межвидовую трансформацию как фактор, осложняющий эффективное применение антибиотиков, нельзя не отметить, однако, что ее роль может быть весьма незначительной в случае, если возбудители смешанной инфекции — филогенетически отдаленные виды (Pakula et al., 1958).

Трансформация устойчивости к антибиотикам в организме животных является основным доводом в пользу возможного участия этого генетического процесса в появлении и увеличении числа антибиотикоустойчивых штаммов.

В наших опытах, насколько нам известно, впервые была осуществлена трансформация стрептококков *in vivo* и были изу-

чены особенности развития компетентности и фенотипической экспрессии у реципиентных клеток в этих условиях. Если сравнивать частоту трансформации стрептококков, которую наблюдали мы, с частотой появления трансформантов в аналогичных экспериментах с пневмококками (Ottolenghi et al., 1963; Такака, 1958, и др.), то существенных различий между ними не отмечается. Нами было показано, что трансформация стрептококков в организме белых мышей происходит при условии, если реципиентные клетки и трансформирующая ДНК вводятся одновременно в брюшную полость или подкожно. При пероральном или внутривенном введении реципиента и ДНК трансформация отсутствует. При обсуждении причин неудачной трансформации стрептококков в кровяном русле прежде всего напрашиваются два объяснения: высокая активность ДНК-азы и эффективность бактерицидных факторов крови. Однако анализ литературных данных показывает, что содержание ДНК-азы в крови очень небольшое (Schak, 1954).

Ledoux (1965) наблюдал при внутривенном введении трансформирующей ДНК из *Bac. subtilis* сохранение ее биологической активности в крови минимум в течение 10 мин.

Bendich et al. (1965) извлекали из кровяного русла активную трансформирующую ДНК пневмококков после ее внутрибрюшинного введения. В свете этих данных наличие ДНК-аз в крови вряд ли является причиной необнаружения трансформации.

Что касается второго объяснения, то оно также не является правильным, так как при высевах стрептококков из кровотока после их внутривенного введения существенного снижения числа жизнеспособных клеток обнаружить не удавалось; более того, в крови находили трансформанты и в том случае, если трансформация происходила в брюшной полости.

Ряд исследователей (см. обзор Ledoux, 1965) указывает, что ДНК при введении ее в кровь может включаться в соматические клетки различных тканей и в результате этого исчезать из кровяного русла. Наблюдалось даже, что трансформирующая активность ДНК пневмококков сохраняется внутри включивших ДНК клеток в течение 1 ч (Вильчок, 1966).

Надо полагать, что причиной отсутствия трансформантов при пероральном введении реципиентных клеток и трансформирующей ДНК является кислая среда желудочного сока и ДНК-азная активность сока поджелудочной железы. Видимо, метод введения через рот в этих опытах не является совершенным, и получение достоверных сведений о возможности трансформации стрептококков в желудочно-кишечном тракте возможно только при непосредственном попадании ДНК и стрептококков в кишечник, что связано с рядом методических трудностей.

В наших исследованиях было установлено, что реципиентные клетки стрептококков способны становиться компетентными в брюшной полости белых мышей, причем развитие компетент-

ности в этих условиях происходит гораздо быстрее, чем в опытах *in vitro*. В то же время процесс фенотипической экспрессии устойчивости к стрептомицину у стрептококков в тех же самых условиях существенно не отличался от такового в пробирочных экспериментах.

Обсуждение этих результатов представляется несколько затруднительным ввиду отсутствия в литературе аналогичных или подобных данных, касающихся других микроорганизмов. Нам кажется, что столь выраженное различие в скорости появления компетентных клеток связано с реакцией серозной оболочки брюшной полости на введение в полость бактерий. Вероятно, в образующемся транссудате содержатся специфические факторы, стимулирующие возникновение у стрептококков способности воспринимать трансформирующую ДНК. Скорее всего это белковая фракция, например альбумины. Можно думать, что активным выделением транссудата обусловлен и более высокий процент трансформантов в брюшной полости, чем в подкожной клетчатке.

Как практически важный можно расценивать экспериментально установленный факт, что реципиент приобретает компетентность *in vivo* и в отсутствие сыворотки.

В 1966 году были получены данные в опытах *in vitro* о том, что в культуре стрептококков наибольшее количество внеклеточной ДНК совпадает с периодом максимальной компетентности реципиентных клеток (А. Н. Климов и др., 1966). Кажется возможным проведение аналогии между этими наблюдениями и результатами Catlin и Ottolenghi (1960), которыми было найдено то же самое соотношение между степенью компетентности и накоплением внеклеточной ДНК у *Neisseria*; дополнительно к этому ими были показаны высокие трансформирующие свойства у ДНК, находящейся в культуральной жидкости в период максимальной компетентности реципиентов.

На основании проведенных исследований мы считаем, что результаты изучения развития компетентности гемолитических стрептококков в опытах *in vitro* и *in vivo* делают во многом обоснованным предположение о способности бактерий становиться компетентными в естественных условиях и принимать участие в процессе генетической трансформации.

Каких-либо существенных особенностей протекания фазы фенотипической экспрессии *in vivo* по сравнению с опытами *in vitro* не наблюдали. Можно допустить, что отсутствие разницы в этом случае объясняется меньшей зависимостью проявления фазы от условий, в которых находится клетка, так как процессы перестройки реципиента в этот период трансформации происходят главным образом на внутриклеточном генетическом уровне.

При изучении влияния некоторых факторов на трансформацию в организме животных было обнаружено несовпадение

в опытах *in vitro* и *in vivo* зависимости биологической активности ДНК от ее концентрации: в пробирке при высоких концентрациях ДНК ее трансформирующий эффект снижался, *in vivo* такой зависимости не наблюдали. Чем можно объяснить это различие? Вероятно, спецификой осуществления взаимодействия ДНК и реципиента в условиях организма. Следует отметить, что для трансформации *in vivo* ДНК требовалось примерно в 10 раз больше, чем в соответствующих опытах *in vitro*. Учитывая этот факт, кажется обоснованным допущение о существовании в брюшной полости факторов, частично инактивирующих биологически активную ДНК (действие ДНК-аз, связывание ДНК клетками брюшины и др.). Не исключено, что эти факторы и являются причиной того, что при повышении концентрации вводимой внутрибрюшинно ДНК до 100 мкг/мл не наблюдается снижения числа трансформантов.

Таким образом, была установлена трансформация устойчивости к стрептомицину у гемолитических стрептококков, находящихся в брюшной полости или подкожной клетчатке. Однако ввиду того, что указанная трансформация происходит фактически в замкнутой стерильной полости организма, может создаться впечатление о несущественном значении этого генетического процесса в осложнениях, связанных с антибиотикотерапией. Определенным противовесом этому мнению могут явиться наши данные о широком распространении стрептомициноустойчивых трансформантов из брюшной полости в различные органы и ткани животного (в почки, селезенку, кровь). В связи с этим можно представить, что при инфицированном перитоните, стрептококкозах подкожной клетчатки и других подобных заболеваниях резистентные к антибиотикам трансформанты не остаются в очаге поражения, а весьма эффективно распространяются по всему организму. Кроме того, полученные нами данные, а также результаты других исследователей дают основание утверждать, что, несмотря на неудачи, по всей вероятности методического характера, трансформанты могут возникать в кишечнике, бронхах и других органах и тканях организма. А отсюда возникает необходимость в изыскании лекарственных препаратов, подавляющих передачу устойчивости к антибиотикам при трансформации.

В этой главе мы не будем обсуждать полученные результаты с точки зрения механизма антибактериального действия пенициллина и хлорамфеникола, а ограничимся только сопоставлением наших данных с данными ряда авторов, изучавших влияние некоторых антибиотиков на развитие устойчивости бактерий к стрептомицину.

Например, в работе Kimmelman et al. (1951) показано, что пенициллин значительно уменьшает число стрептомициноустойчивых вариантов возбудителей инфекции мочевых путей, в том числе и стрептококков, при совместном применении со стрепто-

мицином. Аналогичные результаты, но при лечении больных стрептококковым эндокардитом были получены Robbins et al. (1951).

Анализ этих исследований в совокупности с обсуждаемыми данными позволяет выдвинуть рабочую гипотезу о том, что одним из механизмов синергизма стрептомицина с пенициллином и хлорамфениколом может быть подавляющее действие последних на межбактериальную передачу устойчивости к стрептомицину. Необходимо подчеркнуть, что механизмы синергизма и антагонизма различных антибиотиков в настоящее время почти неизвестны (С. М. Навашин, И. П. Фомина, 1974а). В связи с этим представляется интересной постановка экспериментов, подтверждающих или отвергающих нашу гипотезу.

Разумеется, что сказанное выше далеко не исчерпывает всей проблемы участия генетической трансформации в возникновении и распространении устойчивых к антибиотикам бактерий. Вполне возможно, что роль трансформации в увеличении числа антибиотикоустойчивых микроорганизмов весьма проблематична, а если сравнивать относительное значение этого процесса с конъюгацией и трансдукцией, то можно с уверенностью сказать, что трансформация наименее значима из них для распространения резистентных штаммов. Вместе с тем было бы неправильно с учетом опубликованных данных и приводимых в этой главе экспериментальных результатов полностью исключать генетическую трансформацию из числа потенциальных факторов, снижающих эффективность антибиотикотерапии.

ПЕРЕДАЧА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ КОНЪЮГАЦИИ И ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС

Если трансформация бактерий сыграла решающую роль при раскрытии генетических функций ДНК, то открытие конъюгации бактериальных клеток послужило основой для создания новой науки — генетики бактерий.

Это открытие было сделано в 1946 году Lederberg, Tatum (1946). В своих опытах они использовали ауксотрофные мутанты культуры *E. coli* K-12 и показали, что при смешивании их на синтетической среде с частотой $1 \cdot 10^{-6}$ возникают прототрофные колонии. Было высказано предположение, что в смешанной культуре происходит обмен генетическим материалом между ауксотрофами, необходимым условием для которого является контакт (конъюгация) бактериальных клеток.

Действительно, последующие эксперименты подтвердили эту гипотезу (Tatum et al., 1947; Anderson, 1952; Anderson et al., 1957, и ряд других).

В большом количестве обзоров (С. З. Миндлин, 1964; С. И. Алиханян и В. Б. Суходолец, 1964; Д. М. Гольдфарб,

1965) и монографий (Ф. Жакоб и З. Вольман, 1962; С. Е. Бреслер, 1963; Хейс, 1965; Стент, 1974) и др. довольно подробно освещены вопросы, связанные с конъюгацией бактерий.

В связи с этим не представляется необходимым делать подробный исторический обзор развития исследований конъюгации и ограничимся только схематичной характеристикой основных особенностей этого генетического процесса.

Было установлено, что при конъюгации двух клеток между ними формируется цитоплазматический мостик, через который генетический материал одной клетки (донора) переходит в другую (реципиент).

Процесс конъюгации состоит из следующих фаз:

1. Образование специфических пар в результате случайного соединения клеток противоположного пола (многие авторы называют F^+ и Hfr -донорские клетки «мужскими», а F^- -реципиентные клетки — «женскими»).

2. Превращение специфических пар в эффективные пары. Эта фаза заключается в образовании эффективного контакта, необходимого для генетического переноса, мобилизации генетического материала донора для переноса и обеспечения переноса необходимыми источниками энергии. При подходящих условиях среды и при соответственной плотности клеточной популяции фаза быстро завершается, и практически все возможные скрещивания происходят в первые 30 мин после смешивания культур донора и реципиента.

3. Третий этап состоит в ориентированном переносе хромосомного сегмента от Hfr -донора в клетку F^- -реципиента, причем генетические локусы, расположенные в хромосоме Hfr -клеток в линейном порядке, переходят в клетку реципиента в определенной последовательности. Начинается процесс переноса локусов всегда с определенной для каждого Hfr -штамма начальной точки хромосомы (О). Перерыв этого процесса скрещивания не нарушает последующего включения в генетическую систему рекомбинанта генетических маркеров, уже перешедших в клетку реципиента. Даже без искусственного прерывания процесса иногда происходят самопроизвольные (спонтанные) разрывы хромосомы донора при переносе, и поэтому в отдельных конъюгирующих парах длина перенесенного фрагмента бывает различной. В результате переноса образуется частичная зигота, или мерозигота, включающая всю хромосому F^- -реципиента и фрагмент хромосомы Hfr -донора.

Два последних этапа (4-й и 5-й) — интеграция генов Hfr -штамма с образованием рекомбинантной хромосомы и фенотипическое проявление бактерий-рекомбинантов — свойственны всем известным процессам переноса генетического материала у бактерий, т. е. трансформации, трансдукции и конъюгации.

Первые опыты, доказывающие существование конъюгации в условиях организма, были проведены японскими учеными

Akiba et al. (1960), Kagiwada et al. (1960), которые показали, что перенос множественной лекарственной резистентности может иметь место в кишечном тракте белых мышей, собак, а также людей (в опытах с добровольцами). При этом Akiba наблюдал значительно меньшую эффективность переноса устойчивости *in vivo* по сравнению с результатами экспериментов *in vitro*.

Позднее Schneider et al. (1961) была изучена генетическая рекомбинация *E. coli* K-12 H/r W-1895 (Sm^r) и *S. typhimurium* TM-9 в кишечнике белых мышей. Предварительно путем введения мышам через рот стрептомицина, эритромицина и микостатина в течение суток достигалась относительная стерильность животных. Рекомбинанты можно было выделить из испражнений в значительном количестве (10^3 — 10^4 бактерий в 0,01 г) уже через 24 ч после введения донора и реципиента.

В течение последующих 3—4 дней рекомбинанты продолжали размножаться, образуя основную часть кишечной микрофлоры, и высокое содержание их ($10^7/0,01$ г) сохранялось в течение 48 ч.

Stenzel (1963) установил принципиальную возможность межродовой конъюгации между *E. coli* K-12 и *Shigella* в мочевом пузыре морской свинки. В этих опытах был получен перенос устойчивости к стрептомицину.

Kasuya (1964) осуществил передачу множественной лекарственной устойчивости между штаммами бактерий родов *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella* в кишечнике стерильных мышей. Эта модель, по мнению автора, позволяет избежать применения антибиотиков для подавления нормальной кишечной флоры, исключая тем самым возможность формирования устойчивых культур за счет селекции в присутствии этих препаратов. Показана взаимная передача резистентности к ряду антибиотиков между названными кишечными бактериями при условии свободного размножения доноров и реципиентов в кишечнике экспериментальных животных.

Уровень и тип резистентности, приобретаемой клетками реципиентов, соответствовал таковому штаммов доноров. Приобретенная резистентность могла быть передана другим чувствительным бактериям. В контрольных опытах, при заражении мышей только бактериями реципиента, последние не становились антибиотикоустойчивыми. Воспроизведена передача лекарственной устойчивости в кишечнике нестерильных мышей, обработанных перед заражением стрептомицином и эритромицином.

Плазмидную передачу устойчивости *in vivo* главным образом в условиях кишечника наблюдали многие другие исследователи. Novick с соавт. (1967b) сообщают, что кишечник белых мышей оказался подходящей средой для межбактериального переноса резистентности к стрептомицину, новобиоцину, эритромицину и пенициллину.

Guinea r-д
редачи
in vivo несл
наблюдали
тигити в х
тетрацикли
чили при н
биотки.
(1971), ко
возможнос
плазмидно
бактерий в
передачу
животных,
щего в жи

Большо
ности меж
венным ве
проведенн
птицами

В поря
реносе R-
Witchitz
И. М. Тер

С точ
фективно
конъюгац
дования,
ные хими
щества.

Rilly,
конъюга
этот ант
в то же
число ре
мицина

В оп
23 произ
венной
штаммо
на обра
ствители

Из
стил-ТМ
лин и
в обеих
обладал
нового

Guinsee (1968) показал, что в некоторых случаях частота передачи *r*-детерминант устойчивости к тетрациклину у *E. coli* *in vivo* несколько выше, чем в опытах *in vitro*. В последующем наблюдали перенос *R*-фактора (Tc) от *E. coli* в клетки *S. typhimurium* в желудочно-кишечном тракте телят, получавших хлортетрациклин как стимулятор роста. Аналогичные данные получили при исследовании поросят, диета которых содержала антибиотики. Интересный цикл исследований осуществил Smith (1971), который не только убедительно продемонстрировал возможность эффективного внутривидового и межвидового плазмидного переноса устойчивости к антибиотикам у энтеробактерий в кишечнике цыплят, телят и поросят, но и установил передачу резистентности от штаммов, обитающих в кишечнике животных, штаммам кишечных бактерий персонала, работающего в животноводстве или ветеринарии.

Большое значение для развития представления об эффективности межбактериального переноса резистентности к лекарственным веществам при конъюгации *in vivo* имеют эксперименты, проведенные с гнотобионтами — безмикробными животными или птицами (Walton, 1971; В. В. Сорокин, 1975).

В порядке обзора опубликованных в литературе данных о переносе *R*-факторов *in vivo* следует указать на работы Chabbert, Witchitz (1972), Wiedemann (1972), Chabbert и соавт. (1969), И. М. Терешин и соавт. (1969а, в).

С точки зрения изыскания лекарственных препаратов, эффективно подавляющих процессы переноса резистентности при конъюгации в организме, интересны экспериментальные исследования, в которых применялись антибиотики или малотоксичные химиотерапевтические препараты и другие химические вещества.

Rilly, Pardee (1962) при воздействии стрептомицином на конъюгацию *Hfr*- и *F*⁻-клеток *E. coli* K-12 констатировали, что этот антибиотик подавляет эффективное спаривание бактерий, в то же время хлорамфеникол в среднем в 3—4 раза повышал число рекомбинантов. Отмечено подавляющее действие стрептомицина на образование рекомбинантов у *V. cholerae*.

В опытах Hayshi и соавт. (1965а, б) изучалось действие 23 производных триметиламмония (ТМА) на перенос множественной лекарственной резистентности (*R*) от резистентных штаммов *Sh. flexneri* к чувствительным штаммам *E. coli*, а также на обратный перенос *R*-фактора от резистентных *E. coli* к чувствительным *Sh. flexneri*.

Из числа исследованных соединений додецил-ТМА, миристил-ТМА, октодецил-ТМА, додецил-бензил-ТМА, миристоил-хлорид и бензетоний-хлорид ингибировали перенос *R*-фактора в обеих системах при концентрациях 10—40 мкг/мл, а также обладали некоторой антимикробной активностью. Применение нового метода оценки, исключая влияние антимикробной

активности, позволило считать, что эти вещества оказывают специфическое действие на перенос *R*-фактора.

Пропил-ТМА, бутил-ТМА, амил-ТМА, гексил-ТМА, октил-ТМА, и бензил-холин не тормозили и не ускоряли рост *Shigella* и *Escherichia*, но в их присутствии наблюдалось ускорение переноса множественной лекарственной резистентности.

При изучении соотношения между химической структурой в ряду галогеноидов алкильных производных ТМА был отмечен следующий факт: соединения, содержащие в боковой цепи от 3 до 8 атомов углерода, ускоряли перенос множественной лекарственной резистентности, а соединения, содержащие от 12 до 18 атомов углерода, ингибировали его.

Hayshy изучал связь между химической структурой производных акридина и их ингибирующим действием на перенос множественной лекарственной резистентности. Было исследовано действие 17 производных акридина и родственных ему соединений на перенос множественной лекарственной резистентности от резистентного донора *Sh. flexneri* к чувствительному реципиенту *E. coli* и на обратную передачу устойчивости.

Установлено, что профлавин, ацетилпрофлавин, акридиновый оранжевый, акридиновый желтый, акрифлавин и тиофлавин Т ингибировали перенос множественной лекарственной резистентности при довольно низких концентрациях: от 5 до 40 мкг/мл.

Изучалось ингибирующее действие 8 видов высших жирных кислот с числом атомов углерода от 12 до 24 на перенос множественной лекарственной резистентности от резистентных кишечных палочек к чувствительным дизентерийным палочкам. Было показано, что миристиновая кислота и другие соединения, содержащие 12—18 атомов углерода, ингибируют перенос при концентрациях 0,03—0,25% (300—2500 мкг/мл), а соединения с числом атомов углерода от 20 до 24 не оказывали ингибирующего действия. Выводы этой работы относительно активности соединений с числом атомов углерода от 12 до 18 хорошо согласуются с результатами, полученными Hayshy (1965) в опытах с додецил-ТМА (C_{12}) — октодецил-ТМА (C_{18}).

Тот факт, что алкильные производные ТМА эффективны при более низких концентрациях, чем жирные кислоты, означает, что эффективность ингибирования переноса множественной лекарственной резистентности связана не только с числом атомов углерода, но и с химической структурой вещества в целом.

Arai и Watanabe (1967) провели изучение действия акрифлавина на перенос различных типов плазмид, включая *R*-фактор, и бактериальной хромосомы *E. coli* K-12. Было найдено, что краситель оказывал подавляющее действие на передачу плазмидных факторов в основном только после воздействия на донорские клетки. Интересно отметить, что акрифлавин не только угнетал перенос *R*-факторов, но и заметно подавлял их феноти-

пическую экспрессию. Авторы рассматривают полученные результаты как факты, свидетельствующие в пользу гипотезы о необходимости репликации ДНК в клетках донора для эффективной передачи *R*-эписомных факторов.

Г. Н. Нещадим (1972) испытал активность разнообразных веществ в отношении межбактериального переноса *R*-факторов. В опытах с *E. coli* были изучены следующие препараты: рифампицин, брунеомицин, производные 5-нитрофурана (фурагин, фуразолин, фуракрилин), производные фенотиазина (трифтазин, фторацизин, этаперазин, метеразин), протамин, полимиксин М, циклофосфан, фузидин, бацитрацин и линкомицин.

В результате проведенных исследований было установлено, что рифампицин, вносимый в конъюгационную смесь в самом начале конъюгационного процесса, оказывал ингибирующее действие на перенос *R*-устойчивости к ампициллину, стрептомицину, хлорамфениколу, неомицину и сульфаниламидам, коэффициент ингибиции (понятие введено автором и выражает соотношение R^+ -реципиентов в системах с изучаемым препаратом и в контроле) был равен 7,5 и 14,0 соответственно.

При воздействии этим антибиотиком на различные этапы конъюгационного *R*-переноса отмечалось, что рифампицин, не предупреждая образование специфических контактов между донорскими и реципиентными клетками, вызывал существенные повреждения в клетках, нарушая процесс конъюгационного переноса *R*-факторов. При изучении действия рифампицина на компетентность донорских клеток было показано, что предварительная обработка их антибиотиком не нарушала процессов передачи такими клетками *R*-факторов.

Предварительное воздействие рифампицином на реципиентные клетки или совсем не отражалось на восприятии ими *R*-факторов (при кратковременной обработке), или число резистентных реципиентов понижалось незначительно.

При изучении производных 5-нитрофурана в аспекте ингибиции ими переноса *R*-факторов было показано, что фурагин, фуракрилин и фуразолин подавляют передачу *R*-факторов при конъюгации.

Предварительная обработка донорского штамма фуракрилином приводила к определенному снижению образования числа R^+ -реципиентов. Обработка фуракрилином реципиентного штамма не отражалась на его способности воспринимать *R*-факторы. В опытах Г. Н. Нещадима нитрофураны не вызывали полной блокады переноса *R*-факторов, что отмечалось ранее (Б. А. Шендеров, 1971). Возможно, это объясняется, как полагает автор, применением в его опытах системы с дерепрессированным *R*-фактором, передающимся с высокой частотой.

Другие препараты (брунеомицин, производные фенотиазина, циклофосфан, полимиксин М, фузидин, бацитрацин, линкомицин) не оказывали существенного влияния на конъюгационный

перенос *R*-факторов, или снижение *R*-переноса было обусловлено значительным уменьшением числа донорских и реципиентных клеток в результате бактерицидного действия некоторых препаратов в изученных концентрациях (брунеомицин).

Высокая ингибирующая активность рифампицина в отношении конъюгационной передачи устойчивости к лекарственным веществам отмечалась и в работах других исследователей (А. Ф. Мороз и соавт., 1973, 1975; Mandi, Beladi, 1974, и др.).

С учетом данных литературы о молекулярных механизмах действия рифампицина Г. Н. Нецадим (1972) полагает, что причина угнетения переноса *R*-факторов определяется взаимодействием рифампицина с РНК-полимеразой.

Л. И. Глатман (1972) исследовала 30 различных соединений на способность к подавлению переноса *R*-факторов. В результате было установлено, что «выраженное статистически достоверное угнетение межбактериальной передачи устойчивости к стрептомицину, ампициллину, неомичину, хлорамфениколу и сульфаниламидам вызывают рифампицин, некоторые производные 5-нитрофурана, бромистый этидий, пиронин и кофеин. Наличие ингибирующего эффекта названных веществ не зависело от штамма микроба-хозяина, *fi*-типа, *R*-фактора и состояния его дерепрессии». При изучении механизмов действия кофеина на *R*-передачу было найдено, что он не вызывает элиминации *r*-детерминант из изученных *R*-факторов, не препятствует образованию донорско-реципиентных пар и процессу фенотипической экспрессии. Обнаружено снижение донорской компетентности *R*⁺-клеток без изменения реципиентной способности *R*⁻-клеток. Учитывая способность кофеина инактивировать некоторые ферменты, автор предполагает, что препарат подавляет активность ферментов, необходимых для нормального осуществления переноса ДНК *R*-факторов или их репликации.

Противовирусный антибиотик дистамицин А оказался эффективным (Sanfilippo, 1971) при изучении его подавляющего действия на перенос множественной устойчивости от донорских штаммов *E. coli* и *S. typhi* к реципиентному штамму K-12. Антибиотик проявлял ингибирующую активность только при добавлении в конъюгационную смесь. Предварительная обработка донора и реципиента препаратом была неэффективна, не отмечалось и элиминирующего действия дистамицина А.

В литературе имеются сообщения о торможении или полном угнетении переноса *R*-факторов *in vitro* различными солями жирных кислот, додецилсульфатом, митомицином С, солями малоновой кислоты и 2,4-динитрофенолом, перйодатом натрия, 5-бромурацилом, налидиксовой кислотой (цит. по Hayshi et al., 1965b), противовирусным препаратом метисазоном (Е. П. Сиводский, 1973), фурагином (Б. А. Шендеров, 1971), рядом антибиотиков: клиндамицином, левавторфаном (Lioser et al., 1971), эритромицином и гигромицином В, протамином (Р. Е. Эльгарт,

1972; И. И. Белоусова с соавт., 1973в; В. В. Сорокин, 1975), рехиномицином (Poli et al., 1972). На последнем препарате следует остановиться несколько подробнее, так как названный антибиотик выделен в лаборатории Umezawa (Япония) в результате широкого поиска антибиотических веществ, специфически подавляющих перенос *r*-дестерминант. По мнению авторов, антибиотик представляется перспективным с точки зрения его использования для предотвращения распространения резистентности к антибиотикам путем эпизомной передачи.

Ряд работ посвящен описанию способов угнетения межбактериального переноса *R*-факторов *in vivo*. Smith (1971) в результате изучения большого количества антибиотических веществ и ингибиторов, которые он добавлял в рацион цыплятам, пришел к выводу, что наиболее существенное подавление переноса лекарственной устойчивости *in vivo* отмечалось в опытах с фуразолидоном и сульфадимидином, менее активными были окситетрациклин и неомицин.

О выраженном подавляющем действии дезоксихолата Na на перенос устойчивости к тетрациклину, ампициллину, хлорамфениколу и канамицину в опытах с поросятами-гнотобионтами сообщил Wiedemann (1972).

Результаты исследований *in vivo* действия протамина показали (В. В. Сорокин, 1975), что при сочетании этого вещества с хлорамфениколом эпизомная передача резистентности *E. coli* к последнему в условиях кишечника безмикробных цыплят заметно подавлялась.

Было изучено автором с сотрудниками действие ряда антибиотиков на передачу эпизомной резистентности к хлорамфениколу и тетрациклину в опытах *in vitro* и *in vivo*, в том числе в брюшной полости и в кишечнике мышей.

В опыт были взяты следующие штаммы: 1) *E. coli* CSH-222, F⁻, Cm^R, Tc^R, Sm^R (500 мкг/мл); 2) *E. coli* W-677, F⁻, Cm^S, Tc^S (3 мкг/мл), Cm^R (1200 мкг/мл).

Кроме названных штаммов, нами для экспериментов было выделено несколько культур *E. coli* и *Sh. flexneri* из патологического материала (инфекционная клиника им. Боткина, Ленинград).

Передача эпизомной резистентности осуществлялась *in vitro* и *in vivo* по методу И. М. Терешина и др. (1965, 1969).

Изучалось действие на перенос устойчивости к хлорамфениколу следующих антибиотиков: полимиксин, эритромицин, стрептомицин, мономицин, неомицин и пенициллин.

В опытах перечисленные препараты исследовали в концентрациях, не более чем на 10—15% подавляющих размножение бактерий.

При исследовании антибиотики добавляли в бульонные культуры донора и реципиента при предварительном выращивании в течение 18 ч или непосредственно в конъюгирующую

смесь донора и реципиента; в этом случае контакт бактерий с антибиотиком продолжался 60 мин.

Результаты влияния антибиотиков учитывали, подсчитывая число переносов резистентности, используя следующие сочетания донора и реципиента:

- 1) реципиент + донор, оба выращенные в присутствии антибиотика;
- 2) конъюгация донора и реципиента в присутствии антибиотика;
- 3) донор, выращенный в присутствии антибиотика, + реципиент;
- 4) реципиент, выращенный в присутствии антибиотика, + донор.

ТАБЛИЦА 8

Действие неомицина, полимиксина, эритромицина, стрептомицина, мономицина, пенициллина, на перенос плазмидной резистентности к тетрациклину и хлорамфениколу (от *E. coli* CSH-222 к *E. coli* W-677) *in vitro*

Антибиотик	Подавление переноса устойчивости (во сколько раз)		Антибиотик	Подавление переноса устойчивости (во сколько раз)	
	Добавление антибиотика при предварительном выращивании	Добавление антибиотика при конъюгации		Добавление антибиотика при предварительном выращивании	Добавление антибиотика при конъюгации
Неомицин	Полностью	400	Стрептомицин	13	0
Полимиксин	50	35	Мономицин	13	5
Эритромицин	18	3	Пенициллин	3,8	1,4

В табл. 8 приведены результаты опытов, в которых перенос устойчивости происходил в смешанной культуре донора и реципиента, предварительно выращиваемых в среде с добавлением антибиотика, а также результаты переноса устойчивости в присутствии того или иного антибиотика. Как видно из таблицы, наиболее эффективным ингибитором переноса устойчивости оказался неомицин. Этот антибиотик полностью подавлял передачу резистентности к тетрациклину и хлорамфениколу в том случае, когда реципиента и донора перед конъюгацией выращивали в его присутствии. Значительный подавляющий эффект отмечали и при добавлении неомицина в период конъюгации: число рекомбинантов снижалось в 400 раз по сравнению с контролем. Полимиксин также оказался весьма действенным ингибитором

переноса резистентности, хотя и менее эффективным, чем неомицин. Предварительное культивирование донора и реципиента в МПБ, содержащем 1 мкг/мл полимиксина, в 50 раз уменьшало количество переносов резистентности.

Не отличались друг от друга по своей подавляющей активности стрептомицин и мономицин: оба антибиотика угнетали образование рекомбинантов в среднем в 13 раз. Несколько более эффективным проявил себя эритромицин, подавляющий передачу резистентности в 18 раз. Весьма незначительным ингибирующим действием на процесс переноса устойчивости отличался пенициллин, который снижал число рекомбинантов всего в 3,3 раза.

ТАБЛИЦА 9

Действие неомицина, полимиксина, эритромицина, стрептомицина, мономицина и пенициллина на перенос плазмидной резистентности к тетрациклину и хлорамфениколу, в зависимости от объема воздействия *in vitro*

Антибиотик	Обработанный донор	Обработанный реципиент	Антибиотик	Обработанный донор	Обработанный реципиент
	Степень подавления (во сколько раз)	Степень подавления (во сколько раз)		Степень подавления (во сколько раз)	Степень подавления (во сколько раз)
Неомицин	300	30	Стрептомицин	4	1,5
Полимиксин	15	12	Мономицин	5	2
Эритромицин	10	1,4	Пенициллин	1,6	3,3

Все испытанные антибиотики, кроме полимиксина, оказались значительно менее эффективными при воздействии непосредственно на конъюгирующую смесь донора и реципиента. При этом пенициллин, эритромицин и мономицин подавляли перенос устойчивости в 1,4—5 раз, а стрептомицин вообще не оказывал ингибирующего действия. Полимиксин, добавляемый в смешанную культуру при конъюгации, угнетал перенос в 35 раз.

В этих же экспериментах была изучена зависимость подавляющего действия антибиотиков от объема воздействия. С этой целью проводили конъюгацию с участием донора, предварительно обработанного антибиотиком, и необработанного реципиента, и наоборот, когда реципиента предварительно выращивали в присутствии антибиотика, а донор брали исходный. Как видно из табл. 9, в большинстве случаев подавляющее действие антибиотиков на перенос устойчивости выражено более резко в случае обработки донора. Эта зависимость, однако,

проявлялась при использовании различных антибиотиков по-разному. Наиболее отчетливо она выражена в опытах с неомицином и эритромицином. Первый из названных антибиотиков при воздействии на донора снижал число переносов в 300 раз,

ТАБЛИЦА 10

Действие неомицина на передачу устойчивости к тетрациклину и хлорамфениколу от *E. coli* к *E. coli* в опытах *in vivo* (внутрибрюшинно)

Концентрация неомицина, мкг/мл	Количество рекомбинантов	Степень подавления переноса
0 (контроль)	$1,0 \cdot 10^{-6}$	—
1,25	$0,5 \cdot 10^{-6}$	В 2 раза
2,5	0	Полностью
5	0	»

ТАБЛИЦА 11

Влияние неомицина на перенос устойчивости к хлорамфениколу от *E. coli* к *Sh. flexneri* в опытах *in vivo* (внутрибрюшинно)

Концентрация неомицина, мкг/мл	Количество рекомбинантов на клетку донора	Степень подавления
0 (контроль)	$2,0 \cdot 10^{-7}$	—
5	$5,0 \cdot 10^{-9}$	В 40 раз
7	0	Полностью

а при воздействии на реципиента — всего в 30 раз. Эритромицин был в 7—8 раз более активен при воздействии на донора, чем на реципиента. Что касается стрептомицина, полимиксина и мономицина, то хотя эти антибиотики более эффективно подавляли перенос устойчивости при выращивании донора с их добавле-

ТАБЛИЦА 12

Действие неомицина на внутривидовую (*E. coli* × *E. coli*) передачу устойчивости к тетрациклину и хлорамфениколу в кишечнике

Концентрация неомицина, мкг/мл	Число рекомбинантов на клетку донора	Степень подавления (во сколько раз)
2,5	$15 \cdot 10^{-9}$	20
5	$1,0 \cdot 10^{-9}$	300
10	0	Полностью
0 (контроль)	$3 \cdot 10^{-7}$	—

ТАБЛИЦА 13

Действие неомицина на межродовую (*E. coli* × *Sh. flexneri*) передачу устойчивости к тетрациклину и хлорамфениколу в кишечнике

Концентрация неомицина, мкг/мл	Число рекомбинантов на клетку донора	Степень подавления (во сколько раз)
2,5	$1,0 \cdot 10^{-8}$	20
5	0	Полностью
10	0	»
0 (контроль)	$2,0 \cdot 10^{-7}$	—

нием в среду, тем не менее зависимость степени подавления от объекта воздействия в этом случае была не так демонстративна, как в опытах с неомицином.

Таким образом, результаты, полученные *in vitro*, показали, что некоторые антибиотики могут в значительной степени по-

давлиять перенос резистентности к хлорамфениколу и тетрациклину.

Особенно эффективным, с этой точки зрения, оказался неомицин, который в определенных концентрациях полностью подавлял передачу антибиотикоустойчивости.

При постановке опытов на белых мышах как при внутрибрюшинной, так и при внутрикишечной конъюгации неомицина в соответствующих концентрациях вводили одновременно с культурами донора и реципиента.

ТАБЛИЦА 11

Действие неомицина на конъюгацию штаммов *E. coli* с эпизомной и хромосомной резистентностью

Кросс <i>E. coli</i> × <i>E. coli</i>	Концентрация неомицина, мкг/мл	Степень подавления переноса устойчивости
CSH — 222 × W — 677	0	—
	3,5	В 980 раз
	7	Полностью
924 × W — 677	0	—
	7	В 520 раз
	30	Полностью
HfrH × W — 677 (хромосомная устойчивость)	0	—
	7	В 4500 раз
	30	Полностью

В табл. 10 и 11 приведены результаты, характеризующие действие неомицина на внутривидовую и межродовую передачу резистентности к антибиотикам в условиях брюшной полости белых мышей. Показано, что неомицин даже в концентрациях 1,25—2,5 мкг/мл, совершенно не подавляющих размножение бактерий *in vitro*, в значительной степени (в 2 раза) или полностью угнетает перенос резистентности (табл. 10).

Такое же действие неомицина отмечалось и в опытах по межродовой передаче резистентности в брюшной полости (табл. 11).

Обнаружив столь значительную активность неомицина при внутрибрюшинном скрещивании, мы поставили перед собой задачу изучить, как действует неомицин на перенос резистентности в среде обитания кишечных бактерий — в желудочно-кишечном тракте белых мышей. Оказалось (табл. 12), что антибиотик действовал на внутривидовой перенос резистентности и в условиях кишечника. Хотя в данных условиях опыта это проявлялось несколько слабее, чем в брюшной полости, все равно ингибирующая активность его оказалась значительной: перенос устойчивости к хлорамфениколу и тетрациклину в присутствии неомицина в концентрациях 2,5, 5 и 10 мкг/мл подавлялся

соответственно в 20, 300 раз и, наконец, полностью. Приблизительно такое же действие неомицин оказывал и на перенос устойчивости к антибиотикам от *E. coli* к *Sh. flexneri* (табл. 13).

Таким образом, этими опытами была продемонстрирована интересная особенность неомицина, выражающаяся в его специфическом подавлении процессов генетического переноса резистентности к хлорамфениколу и тетрациклину.

В развитии этих исследований была изучена связь между

специфическим действием неомицина и локализацией факторов устойчивости в бактериальной клетке. Ответ на этот вопрос можно было получить, проверив, как влияет неомицин на образование устойчивых рекомбинантов в кроссах, в которых роль доноров играли штаммы бактерий с плазмидной резистентностью (*E. coli* CSH-222 и *E. coli*-924) и хромосомной (*E. coli* K12 HfrH Cm^R). Результаты этих опытов приведены в табл. 14. Они показывают, что неомицин независимо от природы резистентности бактерий в значительной степени или полностью подавлял переход генетического материала донора в клетки реципиента и, что следует считать особенно интересным, перенос хромосомной резистентности угнетался неомицином в 5—8 раз более

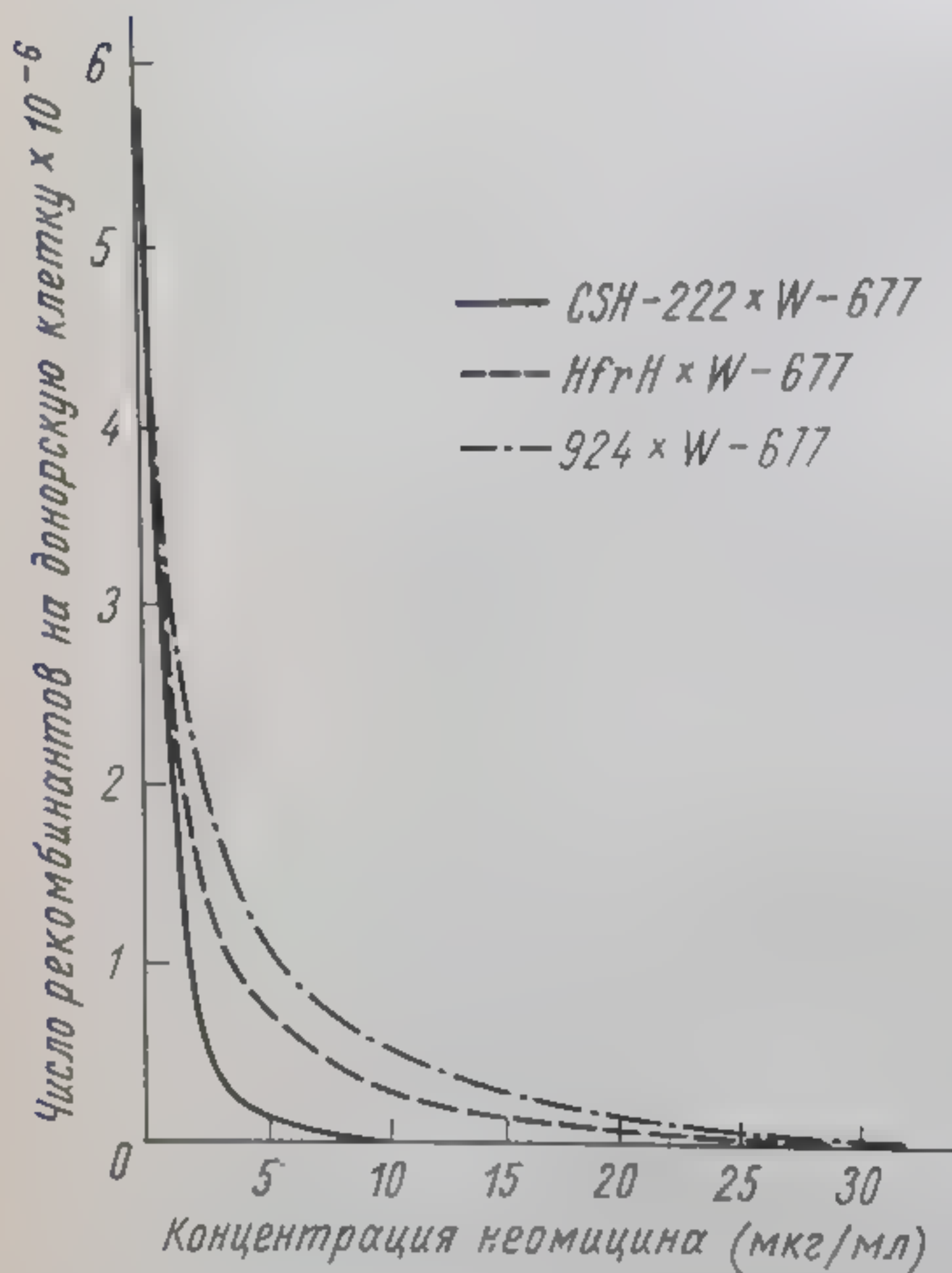


Рис. 2. Действие неомицина на передачу плазмидной резистентности у эшерихий.

интенсивно, чем перенос плазмидной устойчивости. На рис. 2 показана зависимость подавляющего действия неомицина на образование рекомбинантов от применяемой концентрации.

Наряду с вышеописанными опытами, проводилось изучение чувствительности участвующих в рекомбинации систем донорских и реципиентных клеток к неомицину (концентрация 3,5 мкг/мл). Этого удавалось достигнуть путем раздельного предварительного выращивания (18 ч) донора и реципиента с добавлением в культуру неомицина. Следует напомнить, что в указанной концентрации антибиотик не подавлял размножение бактерий. Как видно из табл. 15, во всех изученных скрещиваниях действие неомицина в большей степени сказывалось на клетках донора: их участие в конъюгации в 9—10 раз эффективнее снижало число переносов резистентности, чем в опытах

с обработанным неомицином реципиентом. Вместе с тем вновь было показано, что клетки с хромосомной устойчивостью более чувствительны к действию неомицина, чем клетки — носители плазмидной резистентности. Это относилось как к реципиентным, так и к донорским бактериям.

Таким образом, было установлено, что неомицин является эффективным ингибитором переноса резистентности независимо от ее природы, что он более активно действует на передачу хромосомной устойчивости и, наконец, что донор во всех случаях чувствительнее к влиянию неомицина, чем реципиент.

Результаты действия антибиотиков на генетический перенос устойчивости к хлорамфениколу или к сочетанию последнего с устойчивостью к тетрациклину представляют интерес с двух точек зрения: во-первых, обнаружение антибиотиков, подавляющих передачу устойчивости от клетки к клетке, может иметь практическую ценность, и, во-вторых, применение антибиотиков с извест-

ным в значительной степени механизмом антибактериального действия дает возможность подвергнуть конъюгирующую систему бактерий ингибиторному анализу.

Очевидно, что ряд препаратов (неомицин, полимиксин, эритромицин, пенициллин, стрептомицин и др.) довольно эффективно подавляют перенос эписомной резистентности. И, напротив, некоторые из них не только не угнетают передачу хромосомной устойчивости, но в отдельных случаях стимулируют этот процесс. Например, пенициллин, который при предварительном воздействии на донор в 2 раза повышал число переносов хромосомной резистентности к хлорамфениколу, в то же время в аналогичных опытах с плазмидным переносом угнетал процесс примерно в такой же степени. Сходные результаты были получены и при действии пенициллина на реципиентные клетки.

ПЕРЕДАЧА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ ТРАНСДУКЦИИ И ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭТОТ ПРОЦЕСС

Многие исследователи придают большое значение трансдукции в межбактериальной передаче устойчивости к антибиотикам (Novick, 1967; Novick et al., 1967; Mitsuhashi, 1971).

ТАБЛИЦА 15

Действие неомицина на эписомный перенос резистентности в зависимости от объекта воздействия

Кросс <i>E. coli</i> × <i>E. coli</i>	Обработка неомицином	
	донора	реципиента
	степень подавления переноса	степень подавления переноса
CSH — 222 × × W — 677	В 650 раз	В 59 раз
HfrH × W — 677 (хромосомная устойчивость)	В 1100 раз В 520 раз	В 300 раз В 42 раза

По замечанию Брауна (1968), «трансдуцирующий фаг — это своего рода „трамвай“, так как внутри своей белковой оболочки он перевозит „безбилетного пассажира“ — часть ДНК из предыдущего хозяина фага и вводит эту ДНК таким же образом, как и свою собственную ДНК, в чувствительную к фагу бактериальную клетку». Трансдуцирующие фаги составляют незначительную часть (от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-8}$) от всей популяции фаговых частиц, освобождаемых либо при лизисе бактерии хозяина вирулентными фагами, либо при индукции несущих профаг лизогенных бактерий.

Различают специфическую и неспецифическую трансдукцию (Браун, 1968; Стент, 1974).

Неспецифическая трансдукция была открыта в начале 50-х годов, когда Циндер, студент известного генетика бактерий Ледерберга, пытаясь обнаружить конъюгацию у *S. typhimurium*, нашел третий механизм генетического обмена у бактерий, существенно отличающийся от трансформации и конъюгации, — передачу различных участков генома бактериальной клетки при участии умеренного фага P22.

В общих чертах Zinder, Lederberg (1952) был представлен следующий механизм трансдукции. При размножении фага P22 в чувствительных бактериях небольшой фрагмент бактериальной ДНК проникает в головку дочерней частицы фага. Когда такая «нагруженная» фаговая частица, освободившись из клетки-донора, заражает бактерию-реципиент, бактериальная ДНК инъецируется в клетку, как если бы это была ДНК фага. Если не происходит литической реакции и бактерия выживает, между трансдуцированной бактериальной ДНК и гомологичным участком хромосомы реципиента может произойти обмен. Результатом его оказываются редкие рекомбинанты, носители небольшой части генома клетки донора.

Специфическая трансдукция, при которой реципиентной клетке передаются только некоторые определенные детерминанты донора и которая осуществляется бактериофагами, присоединяющимися лишь к специфическому месту на бактериальной хромосоме, впервые была обнаружена в исследованиях с фагом лямбда (λ) лизогенного штамма *E. coli* K-12 (Morse et al., 1956a, b). Как известно (Campbell, 1957), профаг тесно сцеплен с группой генов, определяющих образование и активность ферментов, участвующих в сбраживании галактозы (Gal); в связи с этим он осуществляет перенос прежде всего названных генов. Были найдены и другие фаги, способные трансдуцировать Gal-признак бактерий (Jacob, Wollman, 1961). Установлено, что фаг ϕ 80 *E. coli*, локализуемый в виде профага рядом с детерминантами, ответственными за синтез триптофана, может осуществлять трансдукцию этих генов.

Наибольший интерес с точки зрения участия трансдукции в межбактериальной передаче резистентности к антибиотикам

представляет неспецифическая (или общая) трансдукция. Рядом авторов было показано, что фаг P22 *Salmonella* может трансдуцировать любой детерминант из очень многих единичных или сцепленных генов, определяющих питательные потребности бактериальной клетки (Demerec, Hartman, 1959), ее серологические (Kauffman, 1953), и ферментативные свойства, вирулентность (Furness et al., 1956), наличие жгутиков (Stocker et al., 1953) и другие признаки.

Первыми из исследователей, кто продемонстрировал в 1959 году возможность трансдукции устойчивости к антибиотикам были Watanabe et al. В дальнейшем было показано (Watanabe et al., 1961b), что посредством трансдукции могут передаваться *r*-детерминанты и что наиболее результативным перенос бывает при участии фага P1 *E. coli* и фага P22 *S. typhimurium*. Фаг P1 обычно трансдуцирует весь комплекс *R*-факторов, так как образующиеся трансдуктанты, как правило, обладают всеми детерминантами резистентности, которые могут быть переданы при конъюгации. С другой стороны, P22-фаг характеризуется гораздо меньшей способностью к захвату *R*-факторов. В частности, с помощью этого фага не удавалось передать детерминанту устойчивости к тетрациклину и, по-видимому, не всегда удается осуществить трансдукцию *RTF*-эписомы, так как перенос трансдуцированных *r*-детерминант при конъюгации происходил далеко не во всех опытах.

Авторы считают, что причины такой разницы в трансдукции с P22- и P1-фагами заключаются в их размерах. По всей вероятности, фаг P22 гораздо меньше фага P1. *R*-Факторы, трансдуцированные P1-фагом, способны к автономной репликации в реципиентной клетке. В противоположность этому в трансдуктантах, которым *R*-факторы были переданы с помощью P22-фага, репликация фактора резистентности может иметь место только после интеграции в геном хозяина.

Обнаружено, что большинство лекарственноустойчивых трансдуктантов, полученных с помощью фага P22, устойчивы к действию последнего. Некоторые из этих трансдуктантов спонтанно и одновременно сегрегируют как устойчивость к лекарственным веществам, так и иммунитет к P22. Watanabe (1971) считает, что между *R*-фактором и фагом P22 происходит рекомбинация. *R*-Факторы, трансдуцированные фагом P22, интегрируются в бактериальную хромосому вблизи локуса пролина. Однако не исключено, что существуют другие точки интеграции, так как последняя возможна и в реципиентах с делецией той области хромосомы, где расположен локус пролина. Watanabe et al. (1966b) показали, что *R*-факторы, трансдуцируемые P-22-фагом, могут интегрироваться в хромосому реципиентных клеток в области, близлежащей с галактозными генами.

R-Факторы могут также трансдуцироваться фагом эпсилон у *S. typhimurium* и *S. newport*. В этом случае трансдукция

по своим особенностям практически не отличается от таковой, которая осуществляется при участии фага P22 (Harada et al., 1963). Найдено, что индуцированный ультрафиолетом лизат устойчивых к тетрациклину трансдуктантов, полученных в опытах с эпсилон-фагом, вызывает трансдукцию с высокой частотой (HFT). Например, устойчивость к тетрациклину трансдуцировалась при титре фага $9,3 \cdot 10^4$ с частотой 5,4 на 10^{-1} формирующих бляшки единиц (Watanabe, Ogata, 1972b).

Данные литературы о возможности трансдукции устойчивости к лекарственным веществам среди различных бактериальных видов довольно обширны.

Cohen et al. (1970) и др. показали передачу устойчивости *S. aureus* к метициллину, эритромицину, стрептомицину и тетрациклину при помощи трансдуцирующего фага 80/E142.

Richmond (1973) приводит данные, из которых сделан вывод о том, что резистентность стафилококков к β -лактамным антибиотикам, тетрациклину и эритромицину практически всегда связана с плазмидами, которые передаются только фагами без образования конъюгационных пар. Автором был выделен ряд штаммов *S. aureus*, устойчивость которых к стрептомицину, неомицину, канамицину, хлорамфениколу и фузидиевой кислоте детерминировалась трансдуцируемыми плазмидами.

Обобщение опубликованных отдельных сообщений и обзорных материалов (Novick, 1967; Watanabe, 1969) дает возможность составить представление о трансдукции у стафилококков резистентности к следующим лекарственным препаратам: пенициллину и другим β -лактамным антибиотикам, эритромицину, линкомицину, тетрациклину, хлорамфениколу, стрептомицину, новобиоцину, неомицину, канамицину, сульфаниламидам, т. е. практически ко всем широко применяемым в медицинской практике антибиотикам.

В 1974 году Lacy, Richmond провели исследования, направленные на выяснение значения межбактериальной передачи путем трансдукции резистентности стафилококков к антибиотикам в клинике. Были подобраны специальные условия эксперимента (суспензия донорских и реципиентных клеток *S. aureus* в человеческой сыворотке, в качестве добровольца выступал один из авторов и т. д.). В результате проведенных опытов авторы сделали заключение о возможности передачи *in vivo* на поверхности кожи человека плазмидной устойчивости к пенициллину, эритромицину, неомицину и тетрациклину. Максимальная частота переноса была характерна для детерминанты резистентности к тетрациклину ($3,5 \cdot 10^{-5}$), минимальная — для резистентности к пенициллину ($1,5 \cdot 10^{-8}$).

Наряду с этими данными в литературе имеются сведения, косвенно свидетельствующие в пользу суждения о наличии трансдукции стафилококков *in vivo* (В. С. Зуева и др., 1969; С. Д. Воропаева, 1973, и др.).

Не
роэгно
и неко
простр
кая ч
чаев
живот
транс
ства
Le
ровал
у стр
пов б
рые г
приоб
стреп
тибно
штам
в том
транс
нием
Пост
ход т
В
носи
риал
ного
ните
цель
соби
к на
альн
каса
миц
отбо
лин
стен
ред
рез
шта
сле
над
лин
зис
кол
ри

Несколько меньшая роль в клиническом аспекте, по всей вероятности, принадлежит трансдукции бактерий кишечной группы и некоторых других видов микроорганизмов. Тем не менее распространенность этого генетического процесса, довольно высокая частота передачи детерминант резистентности в ряде случаев, обнаружение умеренных фагов в кишечнике человека и животных и некоторые другие факторы позволяют включить трансдукцию в число потенциальных путей увеличения количества антибиотикоустойчивых штаммов этих видов бактерий.

Leonard, Colon, Cole (1968) одни из первых продемонстрировали возможность трансдукции хромосомной резистентности у стрептококков группы А. Исследователи использовали 5 типов бактериофагов (два умеренных и три вирулентных), которые после пассирования на стрептомицинорезистентном штамме приобретали способность сообщать чувствительному штамму стрептококков довольно высокий уровень резистентности к антибиотикам. Из шести использованных в качестве реципиентов штаммов лишь один мог быть трансдуцирован. Уверенность в том, что генетический обмен осуществлялся именно за счет трансдукции, подкреплялась и экспериментами с использованием дезоксирибонуклеазы и антифаговой иммунной сыворотки. Последняя в отличие от энзима полностью предотвращала выход трансдуктантов.

В генетике бактерий свойство трансдуцирующих фагов переносить относительно небольшие фрагменты генетического материала используется для высокоразрешающего рекомбинационного анализа малых областей бактериальной хромосомы. Применительно к стрептококкам группы А в последние годы с этой целью используется вирулентный фаг А25 (Malke, 1974), способный осуществлять трансдукцию с эффективностью, близкой к наблюдаемой в хорошо изученных системах у других бактериальных видов. Malke были проведены исследования мутаций, касающихся резистентности стрептококков группы А к эритромицину и линкомицину.

В результате мутагенеза нитрозогуанидином и последующего отбора в одних случаях с помощью эритромицина, а в других — линкомицина, исследователем были получены антибиотикорезистентные мутанты стрептококков штамма 56188, способные передавать при трансдукции устойчивость к антибиотикам.

В последние годы возрастает частота выявления в клинике резистентных к макролидным антибиотикам и линкомицину штаммов стрептококка группы А. Опубликованы данные исследования выделенных от больных в одной из провинций Канады штаммов, резистентных одновременно к эритромицину и линкомицину, которые показывают увеличение процента резистентных (плазмидная устойчивость) по отношению к общему количеству проверенных штаммов (Dixon, Lipinsky, 1972). В период с 1968 по 1970 год процент резистентных образцов состав-

лял около 0,05% (10 штаммов из 18 628 проверенных). К 1972 году он увеличился до 1,38%.

При изучении одного из штаммов стрептококков (Malke, 1974), обладающего индуцибельным типом резистентности, была обнаружена его лизогенность по четырем разным фагам. Фаги отличались друг от друга по спектру литического действия, по способности сообщения лизогенного иммунитета, серологической родственности, степени интерференции с другими фагами и трансдуцирующей активности. Один из фагов, антигенно отличный от всех остальных, мог трансдуцировать с высокой эффективностью детерминанты индуцибельной резистентности к эритромицину и линкомицину мутанту этого же штамма, потерявшему резистентность в результате обработки нитрозогуанидином.

Трансдуктанты, отобранные по маркеру резистентности к эритромицину, были резистентны и к линкомицину, и наоборот. Полученные результаты позволили исследователю предположить, что резистентность к эритромицину и линкомицину у некоторых клинических штаммов стрептококка определяется плазмидной структурой.

На модели *Bac. subtilis* осуществлена трансдукция генов, контролирующих резистентность к антибиотикам (Takanashi, 1962). Межвидовая трансдукция была воспроизведена у *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis* при помощи фагов SP-10 и SP-15.

Межвидовая трансдукция генов, контролирующих продукцию пенициллиназы, была продемонстрирована не только при помощи фага SP-15, полученного при индукции лизогенной культуры *Bac. licheniformis*, но и в результате контакта реципиента с донорским фаговым лизатом, содержащим потомство фага SP-15, размноженного на *Bac. subtilis* W-23-Sm^R.

Что касается подавления трансдукционного переноса резистентности, то систематических наблюдений в этом направлении, насколько нам известно, не проводилось. Опубликованы лишь отдельные работы в этой области, среди которых преобладают разработки отечественных авторов.

А. Ф. Мороз и др. (1973) наблюдали подавление рифампицином трансдукции устойчивости к хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину и сульфаниламидам с помощью фага РІКС у *E. coli*. Антибиотик (14 мкг/мл), внесенный в трансдукционную смесь одновременно с фагом, полностью подавлял передачу R-факторов. Снижение частоты трансдукции резистентности в 35—40 раз отмечали при добавлении рифампицина после 5-минутного контакта фага с культурой реципиента. Предварительная 18-часовая обработка антибиотиком клеток реципиента и трансдуцирующего фаголизата снижала частоту трансдукции в 78—110 раз. Отсутствовало подавляющее действие рифампицина (14 и 50 мкг/мл) на фенотипическую экспрессию трансду-

цированных детерминант резистентности R-фактора, а также на адсорбцию фага реципиентными клетками.

В этой же лаборатории (Н. Г. Анциферова и др., 1973) было изучено влияние бромистого этидия на передачу при трансдукции *E. coli* R-фактора с детерминантами устойчивости к хлорамфениколу, неомицину, ампициллину, стрептомицину и сульфаниламидам. В опытах использовался умеренный фаг РІКС и суббактериостатическая концентрация ингибитора (50 мкг/мл). Бромистый этидий, добавленный сразу же после начала контакта реципиента и умеренного фага, подавлял частоту передачи R-фактора в 100 раз. В опытах, где бромистый этидий был введен в трансдукционную смесь через 5 мин после ее составления, формирование трансдуктантов снижалось в 20 раз. Минимальным было снижение передачи при добавлении бромистого этидия после 20 мин контакта. Этот факт авторы объясняют тем, что данное время соответствует адсорбции 95—98% фаговых частиц РІКС на культуре реципиентного штамма *E. coli* K-12 C-600. Предварительная обработка бромистым этидием клеток реципиентной культуры не влияла на частоту появления резистентных трансдуктантов. Незначительное угнетение эффективности трансдукции (примерно в 2 раза) имело место при предварительной 18-часовой обработке трансдуцирующего фага. Авторы делают вывод, что снижение частоты выхода трансдуктантов является результатом подавления бромистым этидием адсорбции бактериофага на поверхности реципиентной клетки.

По данным Т. Г. Сионской и др. (1975), EDTA и фурагин в опытах *in vitro* ингибировали трансдукцию устойчивости к эритромицину у *S. aureus* соответственно в 200 и 14 раз. При добавлении EDTA и фурагина в период фенотипической экспрессии трансдуцированной в реципиенты детерминанты резистентности выход эритромициноустойчивых трансдуктантов угнетался в 200—600 и 4—6 раз соответственно.

В опытах *in vivo* на модели гнойно-воспалительного очага белых мышей установлено, что у 27% животных, получавших EDTA, и у 13% леченных фурагином передача устойчивости к эритромицину не наблюдалась. Число трансдуктантов, выделенных от остальных животных, было в 36 (EDTA) и 21 (фурагин) раз меньше, чем в контрольных опытах.

Влияние 5-фторурацила на трансдукцию резистентности стафилококков к эритромицину было изучено Т. Р. Пономаревой и др. (1975). Интересно, что в небольших концентрациях пириимидиновое производное (1—10 мкг/мл) несколько стимулировало трансдукцию, увеличение концентрации до 50 мкг/мл снижало частоту трансдукции в 2—5 раз, до 100 мкг/мл — в 10—32 раза, до 200 мкг/мл — в 17—52 раза. При предварительной обработке донорских клеток 5-фторурацилом (20 мкг/мл) частота трансдукции снижалась в 1,7—2,4 раза, а при повышении концентрации препарата до 200 мкг/мл — в 5—10 раз.

В. С. Зуева и др. (1975а, б), как и в опытах Novick (1967), изучали трансдукцию внехромосомных детерминант устойчивости к эритромицину в системе совместного культивирования донорского и реципиентного штамма стафилококков *in vivo* и *in vitro*.

Было исследовано подавляющее действие на трансдукцию профлавина, аминоадаманта и неомицина. Из изученных соединений наиболее активно изменял компетентность стафилококков неомицин. Так, использование в системе скрещивания доноров, предварительно обработанных неомицином в течение 4 ч, снижало число трансдуктантов в 3,3 раза, а обработка в течение 24 ч — в 10 раз. Более значительно неомицин нарушал реципиентную компетентность стафилококков: в системе, в которой присутствовал реципиент, предварительно обработанный неомицином в течение 4 ч, число трансдуктантов было в 100 раз меньше, чем в контрольных пробах. Предварительная 24-часовая обработка реципиентных бактерий почти полностью блокировала процесс формирования трансдуктантов.

На модели гнойного инфекционного очага, который получали введением взвесей донора и реципиента под кожу спины мышам, было изучено влияние неомицина на передачу устойчивости к эритромицину. У 50% животных, которым вводили 50 мкг неомицина непосредственно в очаг в течение 4 дней, не было обнаружено микробов, устойчивых к эритромицину.

Обобщение изложенного в этой главе экспериментального материала не дает оснований для сомнения в определенной роли межбактериального обмена генетической информацией в распространении лекарственной устойчивости среди микроорганизмов — возбудителей инфекционных заболеваний. Очевидно, что наиболее результативными процессами передачи генов — детерминант резистентности от одной бактериальной клетки к другой являются конъюгационный перенос *R*-факторов и трансдукция. Более дискуссионным остается значение для возрастания числа антибиотикоустойчивых бактерий трансформации, однако при рассмотрении этого генетического процесса как потенциального фактора распространения устойчивости к антибиотикам, особенно с точки зрения межвидовых взаимоотношений, роль его полностью исключать нельзя.

В результате обзора путей, методов, средств подавления межбактериальной передачи генов, контролирующих резистентность к антибиотикам, можно сделать вывод о некоторых успехах в этом направлении исследований. Тем не менее работа в данной области науки об антибиотиках предстоит еще большая. Потребуется еще много усилий микробиологов-исследователей, продуцентов биологически активных веществ, химиков-синтетиков, физиологов, бактериологов, а также представителей таких специальностей, как биохимия, молекулярная биология и молекулярная генетика, прежде чем можно будет сказать, что мы располагаем способами надежного угнетения межбактериаль-

ной передачи устойчивости к антибиотикам и другим химиотерапевтическим веществам. При этом следует учитывать, что микроорганизмы, обладающие огромной, эволюционно детерминированной приспособительной способностью, могут вооружаться весьма разнообразными средствами защиты от нежелательных для них воздействий. Примером этому служат данные об обнаружении *R*-факторов, определяющих отсутствие чувствительности процесса конъюгации к производным нитрофурана, которые известны как ингибиторы плазмидного переноса устойчивости.

Глава IV

ПОИСК ПУТЕЙ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НА ОСНОВЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ЕЕ МЕХАНИЗМАХ

ПРИМЕНЕНИЕ МЕМБРАНОТРОПНЫХ И ПОВЕРХНОСТНО- АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ

Актуальную область быстро развивающейся науки мембранологии представляют проблемы изучения действия физиологически активных соединений, в том числе антибиотиков, на биологические мембраны.

Раскрытие основных механизмов мембранотропного действия антибиотических веществ дает возможность рационально осуществлять поиск путей повышения их эффективности, способствует более детальному анализу биологических и физико-химических свойств мембранных структур.

На основе современных представлений об особенностях действия на мембраны некоторых антибиотиков последние можно разделить на пять основных групп: 1) вызывающие общую дезинтеграцию (иногда с явлениями лизиса) мембран (мономицин, стрептомицин); 2) избирательно индуцирующие проницаемость биологических мембран (валиномицин, энниатины); 3) подавляющие биологические функции мембранных стерinov и фосфолипидов (полленовые антибиотики); 4) инактивирующие мембранные ферменты, например транспептидазы (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин); 5) связывающиеся с мембранными фосфолипидами (полимиксины, грамицидин С). Кроме упомянутых антибиотиков, для которых биологические мембраны служат основной мишенью их антибиотического действия, по данным литературы, выраженным действием на мембраны структуры или ферменты обладают: циклосерин — ингибитор мембранных ферментов D-аланин-рацемазы и D-аланил-

D-аланин-синтетазы, олигомицин, подавляющий активность АТФ-азы (Na^+ , K^+), связанной с ядерной и цитоплазматической мембранами, хлорамфеникол, под влиянием которого происходит обогащение мембран липидами (своеобразное «ожирение»), что приводит к нарушению связей в липопротеидном комплексе; циклогексимид, подавляющий биосинтез белков, участвующих в системах мембранного переноса аминокислот и сахаров, производные тетрациклина, образующие хелатные комплексы с ионами кальция, входящего в состав биологических мембран (Л. А. Пирузян и соавт., 1974; Ю. О. Сазыкин, 1968).

Большое внимание исследователей со времени начала широкого использования антибиотиков в медицине привлекает изменение степени связывания и накопления антибиотических веществ резистентной микробной клеткой (Шнитцер, Грюнберг, 1960; М. Н. Лебедева, С. Д. Воропаева, 1960, и др.). Этот интерес представляется вполне понятным в связи со стремлением исследователей найти пути повышения проницаемости клеточной мембраны резистентной клетки для антибиотиков.

В литературе представлены данные о снижении способности бактериальных клеток «поглощать» антибиотики вследствие приобретения устойчивости к пенициллину и ряду других β -лактамных антибиотиков, хлорамфениколу (Sompolinsky et al., 1968b; Nagai et al., 1972, и др.), полимиксину, эритромицину (Mao et al., 1969), рифампицину (Bergamini, Fowst, 1965), грамицидину С (В. Г. Булгакова и др., 1966), тетрациклину (Franklin et al., 1971; Inoue et al., 1970). Поэтому представлялось интересным и значимым проследить изменение чувствительности бактериальных клеток к антибиотикам при воздействии последних одновременно с веществами, способными увеличить их проникновение в микроб.

В нашей лаборатории изучали изменение уровня устойчивости *E. coli* к тетрациклину под действием протаминов: протамин гидрохлорида, протамин сульфата и экмолина. Протамины легко взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами и, наряду с гистонами, по-видимому, могут участвовать в регулировании генетической информации клетки (Stellwagen et al., 1969).

Имеются данные о противоопухолевой активности протаминов (З. В. Ермольева и др., 1970). Протамин увеличивает терапевтический эффект антибиотиков при одновременном применении в лечебной практике.

Оказалось, что протамин гидрохлорид в концентрации 50—100 мкг/мл усиливает действие тетрациклина на устойчивые к этому антибиотику штаммы *E. coli*. Влияние экмолина, взятого в тех же концентрациях, было более слабым, протамин сульфат оказался неактивным. Сами протамины в исследованных концентрациях практически не подавляли роста *E. coli*, и

только увеличение их концентраций до 200 мкг/мл позволило получить подавляющее действие.

Было подтверждено (табл. 16), что устойчивость к тетрациклину у *E. coli* объясняется в основном снижением способности клеток адсорбировать антибиотик (устойчивые клетки связывают в среднем в 6 раз меньше тетрациклина). Добавление в среду вместе с антибиотиком протамина гидрохлорида приводит к снижению минимальной суббактериостатической концентрации тетрациклина в 4—8 раз. Отмеченное увеличение адсорбции антибиотиков в присутствии протамина на 60—80% дает возможность предполагать, что снижение антибиотикорезистентности в данном случае может быть связано с этим эффектом. Интересно, что увеличение сорбции антибиотика происходит весьма избирательно и не наблюдается у чувствительных штаммов (табл. 17).

Экмолин в меньшей степени увеличивал адсорбцию антибиотика *E. coli*, что коррелирует с его незначительным влиянием на уровень устойчивости клеток к тетрациклину *in vitro*. Протамин сульфат оказался неактивным.

Обнаруженное несходство действия разных протаминов, по-видимому, может быть связано с неоднородностью их структуры и аминокислотного состава. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные З. В. Ермольевой с сотр. (1970) при изучении онкостатического действия этой группы белков.

В литературе имеются сообщения об увеличении проницаемости клетки в присутствии другой группы ядерных белков — гистонов. Показано, что наибольший эффект наблюдается при использовании фракции, богатой аргинином. Высокое содержание аргинина характерно и для протаминов. Однако роль этой аминокислоты в изменении проницаемости клетки под действием основных белков пока не ясна. И. П. Ашмарин и др. (1972) было установлено, что определенные фракции гистонов тимуса телят значительно усиливают *in vitro* действие стрептомицина на *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *Mic. lysodeikticus*, а также тубазида на *Mycobacterium tuberculosis*. Многократное усиление бактериостатической эффективности

ТАБЛИЦА 16

Связывание тетрациклина устойчивыми и чувствительными к антибиотикам штаммами *E. coli*

Штамм <i>E. coli</i>	Уровень чув- ствительности к тетрациклину (в мкг/мл)	Количество связан- ного тетрациклина (в мкг на 1 мг белка)	
		Без про- тамина	с прота- мином
CSH-2	2	837	829
R-103	2	874	861
№ 14	250	117	228
CSH-222	125	200	370

антибиотиков в большинстве случаев достигается при таких концентрациях гистонов (от 0,25 до 50 мкг/мл), которые незначительно подавляют развитие бактерий.

В других опытах (А. Б. Левченко и др., 1975) гистоны, полученные из тимуса, оказались эффективными при воздействии на устойчивые к хлорамфениколу, стрептомицину и эритромицину кишечную палочку и стафилококки, снижая степень резистентности микробных клеток на 20–30%. Отчетливое действие на устойчивость *S. aureus* к хлорамфениколу, тетрациклину и эритромицину оказывала динатриевая соль ЕДТА. В суббактериостатических концентрациях 250–500 мкг/мл она снижала

ТАБЛИЦА 17

Адсорбция тетрациклина клетками *E. coli* в присутствии разных концентраций протамина гидрохлорида в % к контролю

Штамм	Концентрация протамина гидрохлорида в мкг/мл					
	25	50	100	200	300	400 *
CSH-2	—	93	97	102	107	93
№ 14	110	165	188	179	183	182

* Кратковременность экспозиции давала возможность использовать в этих опытах высокие концентрации протамина.

уровень устойчивости к антибиотикам в 5–10 раз. Динатриевая соль ЕДТА не действовала на резистентность к стрептомицину *E. coli*, но оказалась эффективной в сочетании со стрептомицином в отношении *S. aureus*. Устойчивость этого штамма снижалась в 3–4 раза при совместном применении препарата с антибиотиком. Действие динатриевой соли ЕДТА на устойчивость *E. coli* к хлорамфениколу установить не удалось. Однако это вещество в 8–10 раз повышало антибактериальную активность морфоциклина. Применение кальциевых солей ЕДТА было неэффективно. Лизоцим в концентрации 500 мкг/мл оказывал заметное влияние на ингибирование роста только в сочетании со стрептомицином (снижал МПК в 2–4 раза). Предварительная обработка штаммов *E. coli* и *S. aureus* биологически активными веществами не способствовала заметным образом усилению действия антибиотиков на бактериальные культуры.

В другой серии экспериментов (И. М. Терешин и др., 1974а) изучали действие на перенос устойчивости к антибиотикам таких поверхностно-активных веществ, как диметилсульфоксид, дезоксихолат натрия и додецилсульфат натрия (табл. 18). Изучаемые вещества применяли в концентрации от 500 до 1500 мкг/мл в зависимости от штамма. Приведенные данные показывают, что наиболее эффективными оказались диметил-

сульфоксид и дезоксихолат натрия. Устойчивость *E. coli* (табл. 19) к хлорамфениколу снижалась в 2—4 раза, к тетрациклину — в 1,5—2 раза. Дезоксихолат натрия оказывал отчет-

ТАБЛИЦА 18

Действие поверхностно-активных веществ на перенос устойчивости к хлорамфениколу

Вещество	Концентрация (мг/мл)	Подавление переноса устойчивости (во сколько раз)	
		Добавление веществ при предварительном выращивании	Добавление веществ при конъюгации
Диметилсульфоксид	10	2	4
	5	1,6	3
	1	1,2	1,8
Дезоксихолат натрия	5	10	20
	2,5	4	8
	1	1,5	2,7
	10	4	1,5
Додецилсульфат натрия	5	2	9
	1	1,4	4

ливое действие на устойчивость одного из штаммов *E. coli* к стрептомицину, которая снижалась в 6 раз. Действия этих веществ на устойчивости *S. aureus* к хлорамфениколу и стрептомицину, а также на устойчивость *E. coli* к хлорамфениколу

ТАБЛИЦА 19

Действие поверхностно-активных веществ на устойчивость *E. coli* к некоторым антибиотикам
(МПК антибиотиков в мкг/мл)

Шта	Антибиотик	Эффект совместного действия антибиотика			Один антибиотик
		с диметилсульфоксидом	с дезоксихолатом натрия	с додецилсульфатом натрия	
62	Хлорамфеникол	125	125	375	500
14	»	250	125	300	500
61	Стрептомицин	450	200	600	1200
62	Тетрациклин	300	200	400	450

выявить не удалось. Изученные поверхностно активные вещества оказывали более сильное действие на высокорезистентные штаммы *E. coli* с плазмидной устойчивостью к антибиотикам. Как известно, механизм действия этих веществ связан с увеличением проницаемости клеточных мембран (Tomoe et al.,

1968). Кроме того, высокие уровни устойчивости к антибактериальным агентам, видимо, зависят от состояния мембран микробной клетки. Таким образом, снижение резистентности в описанных опытах может быть связано с изменениями проницаемости клеточных мембран. Обсуждая механизм действия некоторых поверхностно-активных веществ на уровень резистентности микроорганизмов к антибиотикам, уместно вернуться к характеристике их действия на межбактериальную передачу устойчивости. Данные об ингибировании переноса устойчивости к хлорамфениколу при конъюгации в известной степени являются подтверждением того, что состояние мембран играет существенную роль в процессе конъюгации (Hirota et al., 1964). Действие различных мембранотропных веществ на потерю *St. aureus* пенициллиназных плазмид было изучено O'tayo (1974). В опыт были взяты додецилсульфат натрия (0,002%), дезокси-холевая кислота (0,32%), цетилтриметилбромид аммония — СТАВ (0,0001%), алкиларилполиэфир этилового спирта — Сурфоник-10 (1,0%), твин-80 (3,2%), тритон X-100 (10%). Самыми активными соединениями проявили себя додецилсульфат натрия и дезоксихолевая кислота — 100% элиминации, в присутствии остальных веществ потеря плазмид была в пределах 1,6—3,3%. Авторами сделан вывод, что действие алкилсульфатов на плазмиды зависит от длины их углеродной цепочки.

Додецилсульфат натрия является, пожалуй, наиболее популярным среди ПАВов объектом исследований, используемых для подавления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. В литературе приводятся данные о снижении под влиянием додецилсульфата натрия устойчивости к неомизину, ка-намизину, карбенициллину и тетрациклину (Ingram et al., 1972), к пенициллину (Sonstein et al., 1972), к спектиномицину (Smith et al., 1970), к метициллину и бензилпенициллину (Bruns, 1973) и к ряду других антибиотических веществ (Wol-dringh et al., 1972; Cho et al., 1975).

Анализ опубликованных данных позволяет считать, что воздействие додецилсульфата натрия на R^+ - и R^- -клетки различно: вещество более токсично для R^+ -клеток.

Как считают Yokota и Akiba (1961), обработка клеток додецилсульфатом ведет к утрате донором способности передавать R -фактор, что может являться результатом лизиса додецилсульфатом на «ворсинки», необходимых для переноса плазмиды. На основании этого заключения авторы предполагают, что R -фактор локализуется на мембране очень близко к R -пилусу и что додецилсульфат лизирует первоначально пилус, а затем локально клеточную стенку; это, в свою очередь, ведет к повреждению R -фактора и его частичной или полной потере.

Inzuka et al. (1969), делая попытку объяснить механизм элиминирующего действия додецилсульфата на R -фактор, приходят к аналогичному выводу, так как по данным Jacob et al.

(1961), F-фактор прикрепляется к цитоплазматической мембране в непосредственной близости от расположения поверхностного антигена, детерминирующего образование F-пилуса.

Среди веществ, изменяющих клеточную проницаемость, довольно широко изучен этилендиаминтетраацетат (ЕДТА). Это соединение, связывая двухвалентные катионы, содержащиеся в клеточной стенке и мембранах бактерий, увеличивает проницаемость этих структур для различных веществ, в том числе и для антибиотиков. При этом затрагивается в основном пассивный транспорт, системы активного транспорта не поражаются (Levie, 1968). Эффект ЕДТА обратим через 2—3 генерации в отсутствие препарата.

При добавлении ЕДТА в среду минимальные бактериостатические концентрации (МПК) ряда антибиотиков для штаммов *S. aureus* — лабораторных и выделенных из патогенного материала (Rawal, 1971) *S. typhi* (Muschel, 1968), *E. coli* (Weiser et al., 1968) значительно снижаются, отмечено синергидное действие сочетания ЕДТА с антибиотиками для *P. aeruginosa* (Weiser et al., 1969).

Введение суббактериостатических концентраций ЕДТА в культуру не сказывалось на активности хлорамфениколазы у *E. coli* и *S. aureus* (Н. Н. Соловьева и др., 1974), но на 30—60% подавляло индукцию пенициллиназы у стафилококка (Gross et al., 1970). Авторы предполагают, что этот эффект обусловлен связыванием ЕДТА магния, необходимого для индукции фермента. В то же время Hamilton-Miller (1965) отмечал увеличение пенициллиназной активности в присутствии ЕДТА за счет увеличения проницаемости клетки для антибиотика-индуктора.

Данные, полученные при исследовании действия ЕДТА, противоречивы. В частности, New et al. (1970) подвергают сомнению синергидный эффект ЕДТА и противобактериальных антибиотиков на устойчивые штаммы энтеробактерий. Они обнаружили, что действие ЕДТА проявляется только в высоких концентрациях и носит аддитивный характер, снижения резистентности не наблюдается. Не исключено, что подобная разноречивость связана с неоднозначностью действия ЕДТА в зависимости от видовой и штаммовой специфичности штамма и типа устойчивости (Reid et al., 1970).

Резюмируя результаты применения додецилсульфата и ЕДТА для преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотическим веществам, следует отметить, что пока еще нет достаточных оснований для того, чтобы рассматривать эти соединения как исходные для создания высокоэффективных средств борьбы с устойчивыми к антибиотикам патогенными бактериями: прежде необходимо провести комплекс работ по снижению токсичности этих мембранотропных препаратов. Однако уже в настоящее время наметились определенные предпосылки для

использования кальциевых солей ЕДТА, обладающих сравнительно низкой токсичностью, в клинике.

Было продемонстрировано значительное повышение чувствительности стафилококков и шигелл к тетрациклину при сочетании последнего с поверхностно-активными производными имидазолина, главным образом с 1-карбоксиметил-2-дидецилимидазолилбетаином.

В опытах Smith (1974) установлена весьма высокая активность *in vitro* и *in vivo* триэтилететрамина (ТРИЕН), существенно повышающего чувствительность *P. aeruginosa* к карбенициллину. Необходимо подчеркнуть, что ТРИЕН представляет собой малотоксичное, нетератогенное поверхностно-активное вещество, применяемое в клинике для лечения больных болезнью Wilsona.

К одним из наиболее важных результатов, полученных исследователями, занятыми поиском путей преодоления устойчивости к антибиотикам, относится открытие нового антибиотика макарбоницина и обнаружение неожиданных свойств у антибиотика флавомицина.

Mitsunashi et al. (1970a) провели исследования по изысканию антибактериальных препаратов, которые бы избирательно действовали на бактериальные штаммы, несущие плазмиды, включая *R*-фактор, и обнаружили, что макарбоницин преимущественно подавляет штаммы *E. coli* с плазмидами, такими как *F*- и *R*-факторы. Штаммы с плазмидами изучали на чувствительность к макарбоницину в сравнении с исходными штаммами без плазмидных факторов. *E. coli* K12 и штамм *E. coli* R^+ смешивали в соотношении 1:10. Если штамм — носитель плазмид был более чувствителен к макарбоницину, чем исходный штамм, следовало ожидать, что процент лекарственночувствительных клеток в смешанной культуре будет возрастать в процессе роста в присутствии макарбоницина по сравнению с ростом в отсутствие антибиотика. Так и оказалось: процент антибиотикочувствительных клеток в смешанной культуре после суточной культивации был 2—16% в отсутствие антибиотика, но возрастал примерно до 50—99% в присутствии 10 или 20 мкг/мл макарбоницина. На основе этих результатов авторы предположили, что макарбоницин подавляет рост клеток с плазмидами более интенсивно, чем бактерий без плазмид. Изучение роста каждого штамма в присутствии различных концентраций макарбоницина подтвердило это предположение. Из литературы известно, что макарбоницин подавляет синтез клеточных стенок *S. aureus*. Клетки *E. coli*, обладатели *F*- или *R*-факторов, образуют f^+ - или r^+ -антигены, которых не обнаруживается у штаммов, лишенных таких эпизом; наличие f^+ - и r^+ -антигенов определяет образование на поверхности бактериальной клетки своеобразных волосков, или «пилусов», которые имеют значение для эффективной конъюгации (Meynell et al., 1968). Принимая

во внимание эти факты, авторы предполагают, что преимущественное действие антибиотика на бактериальные клетки с F^- или R -факторами объясняется его влиянием на волоски, или «пилусы», клеточной стенки. В последующих работах была убедительно продемонстрирована повышенная чувствительность к действию макарбоницина мутантов *E. coli* R^+ или F^+ , дерепрессируемых в отношении образования пилусов. Из 26 мутантов 20 не образовывали волосков и утрачивали как способность к конъюгационной трансмиссии, так и чувствительность к мужским фагам. 12 из этих 20 мутантов давали ревертанты, способные образовывать волоски. Большинство из них одновременно восстанавливали чувствительность к макарбоницину.

Как уже отмечалось, различные антибиотики применяются во многих странах в качестве кормовых добавок для домашнего скота и птицы с целью стимуляции их роста (Jukes, 1971). Вследствие этого значительно возрастает число лекарственно-устойчивых бактерий среди кишечных организмов у таких животных и большинство из них оказывается устойчивым ко многим лекарственным препаратам в связи с наличием R -фактора (Anderson, 1968). Бактерии, устойчивые ко многим лекарственным препаратам и обычно патогенные для человека и животных, такие как сальмонеллы, могут переноситься к человеку от животных. Потенциальная опасность увеличения числа несущих R -фактор бактерий у животных неоднократно обсуждалась; указывалось, что увеличение числа несущих R -фактор бактерий у животных действительно составляет угрозу для здоровья людей. В связи с этим необходимы такие антибиотики в качестве кормовых добавок, которые не будут вызывать у животных увеличения числа несущих R -фактор бактерий (Watanabe et al., 1972a).

Флавомицин (называемый также флавофосфолиполом и мономицином) является антибиотиком, который специально применяется в качестве кормовой добавки для домашнего скота и птицы во многих странах. Watanabe et al. нашли, что R -факторы способствуют повышению чувствительности своих бактерий-хозяев к флавомицину. Бактерии, несущие половой фактор F и колициновый агент *Col*, также показали повышенную чувствительность к этому антибиотику.

Тот факт, что плазмиды дерепрессируемого типа делают более заметной чувствительность к флавомицину их бактерий-хозяев, чем это наблюдается с саморепрессируемыми типами, позволяет предполагать, что наличие волосков может быть решающим для повышения чувствительности бактерий к флавомицину. Сравнительные исследования, проведенные авторами, показали, что флавомицин обладает в 2 раза более высокой антибактериальной активностью, чем макарбоницин, и что между этими двумя антибиотиками существует перекрестная резистентность при воздействии как на штаммы F^+ , так и R^+ .

Известно, что механизм действия флавомицина на *S. aureus* связан с подавлением синтеза клеточных стенок. Лизис бактерий на основе такого же механизма может, вероятно, происходить и у *E. coli* и у *S. typhimurium*. Об этом можно сделать вывод из уменьшения мутности бактериальных культур в процессе их роста в содержащем флавомицин бульоне и по образованию сферопластов в изотонических средах с флавомицином. Наличие половых волосков может, вероятно, облегчить проникновение флавомицина в клетки. Возможно также, что наличие плазмидных элементов (особенно в нерепрессированном состоянии) может индуцировать какой-то механизм повышения чувствительности клеток к флавомицину одновременно с образованием половых волосков (Watanabe et al., 1972b).

Тот факт, что бактерии с *R*-факторами более чувствительны к флавомицину, чем *R*⁻бактерии, даст, как нам кажется, большое преимущество этому антибиотику как кормовой добавке, наряду с его низкой токсичностью и исключительно слабой всасываемостью из кишечника. Особенно обращает на себя внимание то обстоятельство, что бактерии, наделенные *r*-волосками (и, следовательно, донорской способностью), обладают более заметной чувствительностью к флавомицину. Бактерии с *R*-факторами могут мутировать в направлении устойчивости к флавомицину, но эта устойчивость не опосредована *R*-факторами и связана, по-видимому, с мутациями хромосомных генов.

Данные, подтверждающие результаты Watanabe et al. (1972b), получили Brana et al. (1973), которые также наблюдали избирательное подавление роста *E. coli* *R*⁺-клеток флавомицином.

Таким образом, среди мембранотропных и поверхностно-активных веществ можно уже сегодня выделить довольно перспективные соединения с точки зрения их применения как отдельных препаратов или в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами для преодоления устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к лекарственным веществам (в 1974 году японская фармацевтическая компания «Мейдзи Сейка» начала работу по организации производства макарбдомицина в целях использования его для борьбы с резистентными к антибиотикам микроорганизмами).

**ПОВЫШЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ
БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ
КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ ПРЕОДОЛЕНИЯ
УСТОЙЧИВОСТИ**

Одним из подходов к преодолению антибиотикорезистентности могут быть поиски веществ, увеличивающих сродство антибиотика с мишенью, например рибосомами. Такой подход подсказывается, в частности, супрессорными мутациями, приво-

лящими к тому, что генетически резистентные мутанты фенотипически проявляют чувствительность к антибиотику. Причиной реверсии является функциональная взаимозависимость компонентов рибосомы (Apirion and Schlessiger, 1969). Следовательно, среди веществ, способных изменять конформацию рибосомы, могут оказаться такие, которые будут увеличивать сродство рибосомы к тому или иному антибиотику или способствовать восстановлению утраченного сродства.

Было показано, что протамин гидрохлорид в концентрациях, не оказывающих бактериостатического действия на *E. coli*, значительно снижает резистентность этих бактерий

ТАБЛИЦА 20

Связывание C^{14} -хлорамфеникола
рибосомами *E. coli* MRE-600
в разных условиях

Состав инкубационной смеси	Число молей C^{14} -хлорамфеникола, связавшихся с 1 моль рибосом
Рибосомы + C^{14} -хлорамфеникол в буфере TMN-1	$0,75 \pm 0,015$
То же + протамин . . .	$0,99 \pm 0,011$
Рибосомы + C^{14} -хлорамфеникол в буфере TMN-2	$0,63 \pm 0,030$
То же + протамин . . .	$0,69 \pm 0,064$
Рибосомы + C^{14} -хлорамфеникол в буфере TMN-3	$0,66 \pm 0,031$
То же + протамин . . .	$0,81 \pm 0,064$

к хлорамфениколу (Р. Е. Эльгарт, 1959). Поскольку точкой приложения действия хлорамфеникола являются бактериальные рибосомы, было предположено, что один из возможных механизмов наблюдаемого эффекта протамин заключается в увеличении сродства рибосом к антибиотику и, как следствие этого — в усилении действия хлорамфеникола на белковый синтез. Были получены результаты, подтверждающие это предположение. Пытаясь выяснить причину наблюдаемого увеличения связывания хлорамфеникола бактериальными рибосомами в присутствии протамин, мы сделали 2 предположения: а) часть рибосом неспособна связывать антибиотик, а протамин восстанавливает их способность к связыванию; б) протамин увеличивает прочность связи хлорамфеникола с рибосомами, обеспечивая 100% связывание уже при сравнительно низких концентрациях антибиотика.

Для проверки этих гипотез была исследована зависимость между связыванием C^{14} -хлорамфеникола с рибосомами *E. coli* MRE-600 и концентрацией антибиотика (табл. 20). Было установлено, что наблюдавшийся нами эффект протамин объясняется увеличением в его присутствии прочности связи бактериальных рибосом с хлорамфениколом.

Вследствие этого повышалось ингибирующее действие низких концентраций антибиотика на синтез белка (табл. 21). Чтобы выяснить, является ли этот эффект общим для всех основных белков или определяется какими-то специфическими свойствами конкретного препарата, мы исследовали влияние ряда протаминов и гистонов на связывание хлорамфеникола и неко-

торые другие свойства рибосом (табл. 22). Отмечено, что протамин гидрохлорид и гистон вызывали четкий активирующий эффект, в то же время экмоллин практически не влиял на связывание хлорамфеникола. Высокие концентрации экмоллина заметно подавляли связывание.

Судя по наблюдавшемуся различию действия разных основных белков на связывание хлорамфеникола с рибосомами, эффект протамин детерминирован не его поликатионными свойствами. По-видимому, он определяется и не первичной структурой этого протамин, поскольку главным его аминокис-

ТАБЛИЦА 21

Действие хлорамфеникола на синтез полифенилаланина рибосомами, интактными и предварительно обработанными протамином

Рибосомы E. coli MRE-600	Молярная концентрация хлорамфени- кола	Опыт № 1		Опыт № 2	
		имп/мин	% к конт- ролю	имп/мин	% к конт- ролю
Интактные	0	1178	—	679	—
	10^{-6}	1298	110	—	—
	10^{-5}	1117	95	669	99
	10^{-4}	—	—	532	78
Обработанные про- тамином	0	1003	—	577	—
	10^{-6}	625	62	—	—
	10^{-5}	423	42	285	49
	10^{-4}	—	—	161	28

лотным компонентом является аргинин, тогда как у гистона, проявляющего то же действие на связывание хлорамфеникола, преобладает лизин. Не исключено, что существенную роль в эффекте основных белков играет их вторичная структура, с чем, возможно, и связана та пестрая картина, которую наблюдают исследователи при изучении влияния этих веществ на резистентность разных видов бактерий к антибиотикам (Р. Е. Эльгарт, 1972; И. П. Ашмарин и др., 1972). Известно, что поликатионы взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами, как свободными, так и входящими в состав рибосом, стабилизируют их двойную спираль, в результате чего повышается температура плавления нуклеиновых кислот (Inoue et al., 1970). Известно также, что поликатионы изменяют чувствительность рибосомальной РНК к действию панкреатической рибонуклеазы. Автор с сотрудниками использовали оба теста для сравнения взаимодействия разных протаминов с рибосомами.

Ни экмоллин, ни протамин гидрохлорид не вызывали сколько-нибудь заметного изменения температуры плавления рибосомальной РНК E. coli. Не удалось обнаружить корреляции между действием разных протаминов на ассоциацию рибосом

с хлорамфениколом и их влиянием на энзиматическую деградацию рибосомальной РНК. Можно предположить, что протамин в низких концентрациях не взаимодействует или слабо взаимодействует с рибосомальной РНК и увеличение в его присутствии прочности связи рибосомы с хлорамфениколом обусловлено специфическим взаимодействием протамина с рибосомальными белками.

Таким образом, в этих опытах было показано, что протамин обладает «сенситбилизирующим» действием на рибосомы *E. coli*, повышая их чувствительность к действию хлорамфеникола. Не исключено, что этот фактор является определяющим для проявления протамином активности в направлении снижения резистентности некоторых видов микроорганизмов к хлорамфениколу.

Анализ современных представлений о чувствительности белоксинтезирующей системы бактерий к действию антибиотических препаратов и об ее изменениях в связи с приобретением бактериальной клеткой резистентности к антибио-

тикам дает основание сделать вывод, что исследования в направлении изыскания средств трансформации белоксинтезирующей системы устойчивых микроорганизмов в сторону повышения чувствительности к подавляющему действию антибактериальных агентов могут быть одним из путей преодоления антибиотикоустойчивости. Для того, чтобы поиск в этом направлении был более эффективен, необходимо углубленное изучение изменений конформационных и химических свойств рибосом, их связи с мембранными структурами вследствие превращения микробной клетки из чувствительной к антибиотикам в устойчивую. Результаты такого рода исследований позволят более рационально осуществлять поиск веществ, «сенситбилизирующих» рибосомы к ингибирующему действию антибиотиков.

ПОДАВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ, ИНАКТИВИРУЮЩИХ АНТИБИОТИКИ,— ОДИН ИЗ ПУТЕЙ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Как уже отмечалось в I главе, наибольшее значение в клиническом аспекте имеют бактериальные ферменты, инактивирующие β -лактамы антибиотики, аминогликозиды и хлорамфеникол.

β -Лактамазы сильно отличаются от других ферментов, гидролизующих пенициллины и цефалоспорины, в нескольких отно-

ТАБЛИЦА 22

Влияние протамина на связывание C^{14} -Ст с рибосомами

Инкубационная смесь	Число молей C^{14} Ст, связавшихся с 1 моль рибосом
Полная	$0,92 \pm 0,052$
Полная + протамин	$0,64 \pm 0,037$

нениях. Одним из моментов заключается в том, что они широко распространены и в некоторых случаях имеют решающее значение в связи с резистентностью патогенных бактерий к β -лактамным антибиотикам, чего нельзя сказать о таких ферментах, как ацилаза и эстераза, также способных гидролизовать названные антибиотики.

Cole и Sutherland (1966), а также другими исследователями получены обширные данные, говорящие о том, что пенициллиновые ацилазы играют в настоящее время весьма незначительную роль в развитии устойчивости грамотрицательных бактерий к пенициллинам. В одном из исследований Abraham (1972) было найдено, что для образования значительного количества ацилазы бактериями *E. coli* микроорганизм нужно выращивать при низкой температуре, мощной аэрации и с добавлением в культуральную среду фенилуксусной кислоты.

Наибольшее число попыток было предпринято исследователями в направлении поиска путей подавления бактериальных β -лактамаз.

Н. П. Елинов и др. (1968) изучили действие катионных, анионных и неионогенных детергентов на синтез внеклеточной (бактериальной) и внутриклеточной (стафилококковой) пенициллиназы, а также на индукцию синтеза эндопенициллиназы стафилококками.

Оказалось, что катионные соединения обладают различной способностью к подавлению синтеза экзопенициллиназы. Наиболее эффективен в этом отношении цетавлон (радикал C_{16}).

Анионные поверхностно-активные вещества в общем обладали, по данным авторов, более выраженной способностью угнетать синтез экзопенициллиназы, чем катионные соединения. Наиболее энергично действовали некаль и другие вещества этого класса, кроме гексадецилсульфата натрия, обладающего весьма низкой растворимостью.

В отличие от ионных ПАВ неионогенные детергенты не угнетали синтеза внеклеточной пенициллиназы. Из использованных авторами неионогенных ПАВ ни один из твинов не влиял на синтез эндопенициллиназы.

Катионные детергенты не снижали степени индукции фермента оксациллином. В противоположность этому анионные соединения заметно угнетали количество индуцированной пенициллиназы. Особенно эффективными в этом отношении были додецилсульфат натрия и сульфенол. Степень индукции уменьшалась в присутствии 0,005% додецилсульфата почти в $2\frac{1}{2}$ раза по сравнению с контролем.

Один из полиоксиэтиленалкилфенолов — ОП-7, энергично ингибируя синтез пенициллиназы клетками стафилококка, совершенно не влиял на процесс индуцированного синтеза фермента. Одно из вероятных объяснений этого феномена заключается, по мнению авторов, в следующем. Возможно, что детер-

гент (ОП-7) и индуктор (оксациллин) в отношении системы синтеза пенициллиназы действуют как два конкурентных соединения. В отсутствие индуктора детергент угнетает синтез фермента. Добавление же к клеткам индуктора, обладающего значительно большим сродством к изучаемой системе, полностью вытесняет детергент, и индуцированный синтез проходит нормально, как в опыте без ПАВ. Лишь при достаточно высокой концентрации детергент начинает успешно конкурировать с индуктором, вызывая снижение количества индуцируемой пенициллиназы.

Проведенная работа позволила определить следующие основные закономерности угнетения пенициллиназы ПАВами: а) экзопенициллиназа более чувствительна к действию ПАВ, нежели эндопенициллиназа; б) процесс угнетения требует для своего завершения продолжительного времени (от нескольких часов до нескольких суток); в) катионные ПАВ наиболее эффективны в нейтральной и щелочной среде, ингибирующая способность анионных ПАВ возрастает при сдвиге как в кислую, так и в щелочную стороны.

Заслуживают серьезного внимания данные авторов о влиянии изученных ими поверхностно-активных веществ, подавляющих активность пенициллиназы, на уровень устойчивости стафилококков к пенициллину. Было установлено, что анионные ПАВ интенсивно снижают *in vitro* устойчивость к пенициллину пенициллиноустойчивых пенициллиназопродуцирующих стафилококков (с 3000 до 2,8—31 ЕД/мл). В присутствии катионных и некоторых неионных соединений удается достичь лишь незначительного повышения чувствительности стафилококков к пенициллину. В случае предварительной обработки клеток анионными ПАВ и последующего титрования пенициллина в присутствии анионных детергентов устойчивость стафилококков к пенициллину понижается до уровня устойчивости эталонного пенициллиночувствительного штамма (0,022—0,05 ЕД/мл). Способность снижать устойчивость стафилококков к пенициллину связана у анионных ПАВ в основном с угнетением пенициллиназы или элиминацией пенициллиназных плазмид. Некоторые неионные ПАВ (полиоксиэтиленалкилфенолы, например ОП-7) снижают устойчивость, по-видимому, за счет угнетения синтеза стафилококковой пенициллиназы. При испытании на модели острого стафилококкового сепсиса у белых мышей, вызванного пенициллиноустойчивым стафилококком, анионный детергент сульфолон значительно усиливал терапевтический эффект пенициллина. Неионный детергент ОП-7 не влияет на лечение инфекции антибиотиком. Хотя основные материалы по элиминации плазмид представлены ранее (см. главу II), целесообразно рассмотреть данные Д. П. Шраера (1975), посвященные подавлению активности пенициллиназ.

В его опытах наибольшую частоту элиминации пенициллиназных плазмид вызывали 3,6-дiamiноакридины: акрифлавин — 15,6—23,1%, акридин оранжевый — 11,8—13,0%, профлавин — 6,8—8,0%. Выраженной элиминирующей активностью обладали и 9-аминоакридины. Частота элиминации возрастала в зависимости от увеличения концентрации препарата, воздействующего на популяцию пенициллинорезистентного стафилококка, и времени контакта культуры с препаратом. При наличии у феноксазинов в положении «9» диметиламинной группы отмечена невысокая, но стабильная способность к элиминации пенициллиназных плазмид (до 3,2—4,6%). Показано, что наиболее активными ингибиторами продукции пенициллиназы являются профлавин и акрифлавин. Продукция фермента в присутствии суббактериостатических концентраций этих соединений (10,0 мкг/мл) была ниже, чем таковая в интактных популяциях.

Синергизм производных акридина, феноксазинов и аналогов пенициллина автор испытывал в отношении 40 штаммов *S. aureus*, активно продуцировавших пенициллиназу (100,0 ЕД/10⁸ клеток). Оптимальные сочетания возникали преимущественно при комбинировании суббактериостатических концентраций производных акридина и β-лактамазочувствительных пенициллинов. Хороший эффект был получен при использовании в сочетаниях: акридина, риванола, акрифлавина, профлавина, акрихина (эффективность 80,0—100,0%). При испытании комбинаций феноксазинов с β-лактамазочувствительными пенициллинами синергизм был выражен слабее, нежели при использовании акридиновых красителей.

Антистафилококковую химиотерапевтическую активность комбинаций антибиотиков и ингибиторов пенициллиназы автор изучал на модели, позволяющей наблюдать за патоморфологическими изменениями, возникающими в органах животных в процессе размножения в них культуры *S. aureus*. Факты, выявленные в химиотерапевтических экспериментах, показывают, что увеличение боковой цепочки молекулы акридина в положении «9» приводит к повышению способности акридиновых соединений оказывать синергидный эффект при комбинировании с β-лактамазочувствительными пенициллинами в отношении экспериментальной стафилококковой инфекции, вызванной β-лактамазопродуцирующими возбудителями.

Д. П. Шраер (1975) провел исследования, в которых сульфоксид феноксиметилпенициллина и сульфобензилпенициллина применяли в качестве ингибиторов стафилококковой пенициллиназы *in vivo*. Заслуживает внимания более эффективная терапия при использовании сульфоксида феноксиметилпенициллина в сочетании с бензилпенициллином, чем лечение одним бензилпенициллином в опытах на белых мышах. Подобный же положительный эффект отмечен при комбинации сульфона бензилпенициллина с бензилпенициллином в опытах на золотистых

хомячках. Автор предполагает, что при комбинированной терапии, так же как и в опытах *in vitro*, пенициллиназа ингибируется сульфеном или сульфоксидом. Часть популяции стафилококка остается незащищенной (или менее защищенной) от бактерицидного действия бензилпенициллина, чем и объясняется меньшая пораженность подопытных животных.

Yaginuma et al. (1973) испытали ряд ферментных ингибиторов на их действие в отношении способности подавлять активность очищенной цефалоспориин- β -лактамазы. Фермент предварительно инкубировали в дистиллированной воде с каждым из ингибиторов в течение 10 мин при 30°C, а затем остаточную ферментную активность определяли с использованием в качестве субстрата 15 мМ цефазолина. Активность фермента почти полностью подавлялась 1,0 мМ йодом, 1,0 мМ п-хлор-ртуть-бензоатом (Р-СМВ).

В опытах Д. П. Шраера (1975) изучено ингибирующее действие аналогов пенициллина и цефалоспоринов в отношении каталитического гидролиза β -лактамазой *S. aureus* пенициллиназочувствительных пенициллинов.

β -Лактамазы ацетоновых препаратов обоих испытанных штаммов полностью тормозились использованными ингибиторами при субстрате — бензилпенициллине. Несколько менее активным антипенициллиназным действием обладали метициллин и цефалексин (35—100 и 23—78% активности от контроля соответственно). При использовании другого субстрата — ампициллина — ингибирующий эффект аналогов пенициллина и цефалоспоринов оказался менее выраженным, чем при использовании бензилпенициллина и карбенициллина. Среди производных пенициллина активнее других ингибиторов был сульфоксид феноксиметилпенициллина, а среди цефалоспоринов — цефалотин и цефалоридин. Наименьший тормозящий β -лактамазу эффект вызывал цефалексин. При использовании в качестве субстрата карбенициллина ингибирующий эффект аналогов пенициллина и цефалоспоринов был особенно ярким, что, вероятно, связано с большей устойчивостью карбенициллина к стафилококковой пенициллиназе, чем бензилпенициллина.

Авторы выделяют среди производных пенициллина сульфоксид феноксиметилпенициллина, а среди цефалоспоринов — цефалотин и цефалоридин как наиболее активные ингибиторы пенициллиназы *S. aureus*. Наименее эффективным был цефалексин.

Было проведено изучение подавления действия ряда пенициллиназ из *S. aureus*, *Bac. cereus* и *E. coli* производными пенициллинов по карбоксилу, а также веществами, близкими производным пенициллина, содержащим неизмененное β -лактаминое кольцо, но имеющими различные изменения в тиазolidиновом цикле. Наибольшим ингибирующим действием обладал сульфоксид феноксиметилпенициллина. Так, в концентрации

10 мг/мл препарат тормозил действие пенициллиназы *E. coli* на 74%, *Bac. cereus* — 63%, *S. aureus* — на 50%. Другой ингибитор — дигомофеноксиметилпенициллин — также угнетал действие всех исследованных пенициллиназ. Что же касается метициллина, сульфоксидов гомофеноксиметилпенициллина и диазозокетонных производных пенициллина, то они оказывали влияние только на пенициллиназы некоторых спорообразующих микробов и не влияли на стафилококковую пенициллиназу.

Дитиофеноксиметилпенициллин — вещество с расщепленным тиазолидиновым кольцом, но сохранившее β -лактамное кольцо, также обладало некоторым ингибирующим действием. Замена карбоксильной группы в производных пенициллина на диазозокетонную приводило к ингибированию пенициллиназной активности, в то время как введение в молекулу сложноэфирной группы такого эффекта не давало.

Р. А. Макарова и С. М. Чайковская (1963), изучая ингибирующее влияние полусинтетических пенициллинов (метициллина, оксациллина, клоксациллина) и 6-аминопенициллановой кислоты на активность пенициллиназ клинических штаммов стафилококка, *E. coli*, *Bac. cereus*, *Klebsiella*, установили, что величина ингибирующего действия полусинтетических пенициллинов на пенициллиназную активность была пропорциональна концентрации ингибитора. Полусинтетические пенициллины не ингибировали стафилококковую пенициллиназу. Авторами отмечено, что в присутствии метициллина и оксациллина повышается чувствительность пенициллиназообразующих грамотрицательных бактерий к бензилпенициллину и ампициллину.

Kasik et al. (1967) поставили задачу изучить влияние оксациллина, клоксациллина, диклоксациллина, цефалотина, цефалоридина, цефалоспорины С, тетрациклина, хлорамфеникола и линкомицина на инактивацию пенициллина G пенициллиназой *M. tuberculosis*. К внеклеточной пенициллиназе микобактерий добавляли пенициллин G в сочетании с одним из взятых в опыт лекарственных веществ и через 24—72 ч инкубации определяли содержание пенициллина в среде спектрофотометрическим методом. Оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин в концентрации 1—5 мкг/мл тормозили инактивацию пенициллина как *in vivo*, так и в бесклеточном фильтрате, т. е. ингибировали активность внеклеточной пенициллиназы. Степень торможения зависела от количества добавленных препаратов. Тетрациклин, хлорамфеникол, стрептомицин и линкомицин тормозили инактивацию пенициллина лишь *in vivo*, тогда как цефалотин, цефалоридин и цефалоспорин не оказывали существенного влияния.

О сильном подавлении β -лактамаз с преимущественной цефалоспоринозной активностью полусинтетическими пенициллинами, особенно метициллином и клоксациллином, сообщают Cole et al. (1972), Fleming et al. (1969), Hamilton-Miller et al. (1965) и др.

В литературе
действительна
ЕДТА (Gros
ноксида (В
мистого эти
паратов.
Н. Н. Со
лено опреде
и 2 штамм
способность
феразу и во
амфениколу
стью; были
ной активнос
и биологиче
инколацети
веденных и
E. coli 17 о
ностью, из
стентности.
к хлорамфе
феразу кон
только в ре
устойчивос
и были чу
0394 обра
в результа
роду резин
S. aureus
к антибио
Чтобы
тивации
дукты, бы
тате кото
тивности
проведена
никола б
рованных
ной хром
водных х
Были
вации хл
ляет тот
тических
снижая
бактерий
при испо
мина ги

В литературе приводятся также сведения о подавляющем действии на образование β -лактамаз различного происхождения EDTA (Gross et al., 1970), 8-азагуанина, додецилполиэтиленоксида (Bruns, 1973), гемина и гематопорфирина, бромистого этидия, окситетрациклина и некоторых других препаратов.

Н. Н. Соловьевой и И. М. Терешинным (1974) было проведено определение устойчивости 29 штаммов кишечной палочки и 2 штаммов *Staphylococcus aureus* к хлорамфениколу, изучена их способность вырабатывать фермент хлорамфениколацетилтрансферазу и возможность корреляций между устойчивостью к хлорамфениколу и хлорамфениколацетилтрансферазной активностью; были прослежены также условия проявления максимальной активности фермента и оценено влияние ряда антибиотиков и биологически активных веществ на образование хлорамфениколацетилтрансферазы этими штаммами. В результате проведенных исследований было обнаружено, что из 29 штаммов *E. coli* 17 обладают хлорамфениколацетилтрансферазной активностью, из них 13 штаммов имеют плазмидную природу резистентности. Они отличались высоким уровнем устойчивости к хлорамфениколу и вырабатывали хлорамфениколацетилтрансферазу конститутивно. 4 штамма *E. coli* образовывали фермент только в результате индукции и обладали более низким уровнем устойчивости. Остальные штаммы фермента не вырабатывали и были чувствительны к антибиотику. Один штамм *S. aureus* O394 образовывал хлорамфениколацетилтрансферазу только в результате индукции и был устойчивым к 125 мкг/мл (природу резистентности штамма не исследовали). Другой штамм *S. aureus* 209 фермента не вырабатывал и был чувствителен к антибиотику.

Чтобы убедиться в том, что в процессе энзиматической инактивации хлорамфеникола образуются ацетилированные продукты, был проведен щелочной гидролиз последних, в результате которого наблюдалось восстановление биологической активности хлорамфеникола в среднем на 70%. Кроме того, была проведена экстракция ацетилированных продуктов хлорамфеникола бензолом. Последний экстрагировал 80—90% ацетилированных производных хлорамфеникола. Результаты тонкослойной хроматографии также подтвердили наличие ацетилпроизводных хлорамфеникола.

Были обнаружены вещества, подавляющие процесс инактивации хлорамфеникола (табл. 23). Особый интерес представляет тот факт, что они оказывают действие в суббактериостатических концентрациях, тем самым в значительной степени снижая возможность появления устойчивых к ним вариантов бактерий. Это обстоятельство, безусловно, будет иметь значение при использовании парных сочетаний хлорамфеникола с протамином гидрохлоридом, эритромином или пенициллином.

Данные литературы о влиянии различных ингибиторов на активность и синтез бактериальных ферментов, инактивирующих антибиотики, довольно многочисленны.

Обнадеживающими оказались исследования, в которых выявлено ингибирующее действие производных трифенилметанового ряда на хлорамфениколацетилтрансферазу. При комбинации хлорамфеникола и основных трифенилметановых красителей наблюдался синергизм, если объектом исследования служил

ТАБЛИЦА 23

Влияние пенициллина, протамина гидрохлорида, экмолина и пентоксила на образование хлорамфениколацетилтрансферазы

Штамм	Пенициллин		Протамин гидрохлорид	
	Концентрация, мкг/мл	Подавление, %	Концентрация, мкг/мл	Подавление, %
<i>E. coli</i> 14	25—50	0	10	51,2±1,96
<i>E. coli</i> RE 103	25	91,6±2,57	4	42,0±1,96
<i>S. aureus</i> 0394	25	94,2±2,52	4	52,1±2,24

Продолжение табл. 23

Штамм	Экмолин		Пентоксил	
	Концентрация, мкг/мл	Подавление, %	Концентрация, мкг/мл	Подавление, %
<i>E. coli</i> 14	10	40,2±2,52	25—50	0
<i>E. coli</i> RE 103	5	32,0±2,52	4	0
<i>S. aureus</i> 0394	5	37,6±2,24	4	22,4±2,57

резистентный к хлорамфениколу штамм *E. coli*, причиной резистентности которого являлся ацетилирующий антибиотик фермент (Такака et al., 1971). Рост данного штамма слабо подавлялся хлорамфениколом в концентрации до 100 мкг/мл и красителями в концентрации 2—5 мкг/мл. Однако при совместном использовании хлорамфеникола (60 мкг/мл) и кристаллического фиолетового (2 мкг/мл) наблюдали полное подавление роста. В случае чувствительного к хлорамфениколу штамма *E. coli* синергизма при совместном применении красителя и хлорамфеникола не наблюдали. В бесклеточной ферментной системе из *E. coli* образование ацетилированного хлорамфеникола было почти полностью подавлено кристаллическим фиолетовым в концентрации 9 мкг/мл.

Представляют интерес данные о подавлении активности хлорамфениколацетилтрансферазы АТФ и АДФ, что было показано в опытах с ферментом из *E. coli*, R^+ . АТФ и АДФ

в концентрации 5 мМ тормозили активность фермента, конкурируя, правда, не с хлорамфениколом, а с КоА. Пирофосфат, аденозин и 5-АМФ не влияли на ацетилирование хлорамфеникола, а УТФ, ГТФ и ЦТФ подавляли этот процесс слабо по сравнению с АТФ. В опытах со штаммами *E. coli* инактивация канамицина на 80–95% достигалась при добавлении АТФ в количестве 18 мкмоль на пробу. Уменьшение содержания АТФ в реакционной смеси в 2 раза сопровождалось пропорциональным снижением количества инаktivированного антибиотика. Для инаktivации того же количества неомицина, как правило, требовались меньшие количества АТФ. Инаktivация на 60–90% отмечалась при внесении в реакционную смесь 9 мкмоль АТФ. При проведении реакции в присутствии 2,25 мкмоль АТФ на пробу инаktivировалось не более 20% антибиотика. Что касается влияния некоторых энзиматических ядов на инаktivацию канамицина и неомицина бесклеточными препаратами из штаммов *E. coli*, то было установлено, что NaN_3 в концентрации 0,1 М, NaF — 0,05 М, NaAsO_3 — 0,002 М и HgJ_2 — 0,04 М не оказывали заметного действия на инаktivацию антибиотиков. Значительного ингибирования реакций инаktivации не наблюдалось и при увеличении указанной выше концентрации ингибиторов в 5 раз. NaN_3 и NaAsO_3 были практически неактивны. NaF несколько подавлял инаktivацию антибиотиков: неомицина инаktivировалось на 20–23% меньше, чем в контроле; канамицина — на 17–40%. HgJ_2 не подавлял инаktivацию канамицина при использовании в качестве источника энзима *E. coli* 182, при использовании энзима из *E. coli* 886 инаktivация канамицина была подавлена на 24%. Влияние HgJ_2 на инаktivацию неомицина испытать не удалось, так как этот реагент сильно подавлял рост *Bac. subtilis* 633-тест-организма при биологическом титровании (А. С. Демина, 1973).

Заканчивая эту главу, можно сделать вывод, что изучение механизма антибактериального действия представляет собой рациональную основу для направленного подбора химиотерапевтических препаратов, биологически активных веществ и химических соединений, которые при условии отсутствия или низкой токсичности могут оказаться полезными в борьбе с устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам. Более того, приведенные материалы позволяют наметить определенные пути направленного синтеза новых веществ или модификации молекулы ряда известных соединений, которые обладали бы высокой степенью избирательного воздействия на структуры, ответственные за резистентность. Использование таких лекарственных препаратов сегодня является уже не только теоретически возможным, но и применительно к полусинтетическим пенициллинам как ингибиторам β -лактамаз осуществляется на практике. Эти вопросы отражены в следующей главе.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕОДОЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Приведенные в предыдущих главах материалы отражают интенсивный поиск методов борьбы с устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, основанных на изучении интимных механизмов этого явления; однако, как бы интересны и перспективны ни были эти исследования, практическое использование выявленных закономерностей и приемов остается проблемой завтрашнего дня. В силу различных причин, детально оговоренных выше, препараты, предложенные для подавления резистентности бактерий к антибиотикам или процессов межклеточной передачи генетического материала, ответственного за данный признак, могут в большинстве случаев быть применены только в эксперименте. Для клинической практики чаще всего они или вообще не пригодны, или лечение ими требует большой осторожности и не может быть таким широким, как это определяется ситуацией сегодняшнего дня.

Последнее обстоятельство — повсеместное распространение устойчивых к длительно применяемым в медицине противомикробным веществам возбудителей заболеваний человека — побудило использовать иные пути преодоления резистентности, порой более дорогостоящие и менее рациональные, но сегодня несомненно эффективные. К ним можно отнести следующие:

- изыскание новых антибиотиков, активных в отношении устойчивых штаммов микроорганизмов;
- получение на основе химической трансформации «старых» или малоактивных антибиотиков таких препаратов, которые действуют на устойчивые к исходным веществам бактерии;
- создание препаратов или лекарственных форм, дающих возможность повысить концентрацию антибиотика в организме человека;
- сочетанное применение антибиотиков;
- применение антибиотиков вместе с другими биологически активными веществами.

Естественно, что первоосновой борьбы с устойчивостью микроорганизмов остается строгое соблюдение принципов антибиотикотерапии; это безусловно, но освещение этой большой проблемы не является задачей настоящей монографии, и она будет затронута только в аспекте обсуждаемого вопроса.

Преодоление резистентности бактерий путем использования для лечения больных новых антибиотиков или антибиотических препаратов, полученных на основе химической трансформации и отличающихся оригинальными противобактериальными свойствами, является наиболее распространенным и пока наиболее

эффективным приемом. Верно, последние 10-15 лет роль новых антибиотиков в борьбе с бактериальными инфекциями значительно уменьшилась (находка перспективного антибиотика стала сравнительно редким явлением), зато резко возросло значение полусинтетических антибиотических препаратов. Можно без преувеличения сказать, что с середины 60-х годов современная медицина переживает эпоху направленного изменения противомикробных свойств антибиотиков на основе химической трансформации их молекулы. Объектами наиболее интенсивного и полезного изучения в этом плане явились пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, рифамицины, а также линкомицин, тетрациклины и некоторые другие антибиотики. Работа с ними преследовала решение следующих задач:

- создание препаратов, активных в отношении штаммов, приобретших устойчивость к исходному антибиотику;

- получение на основе старых антибиотиков их производных с измененным (обычно в сторону расширения) спектром действия;

- синтез препаратов с большей противомикробной активностью по сравнению с активностью исходного вещества;

- получение антибиотиков с улучшенными биофармацевтическими и фармакокинетическими свойствами.

Естественно, что в ряде случаев новое вещество обладает по сравнению с исходным не одним, а несколькими отличительными полезными свойствами.

Среди перечисленных антибиотиков сегодня, с точки зрения их практической значимости, прежде всего должны быть названы полусинтетические пенициллины. Известно, что основным структурным выражением молекулы пенициллинов, в том числе бензилпенициллина, является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК), впервые выделенная в 1957 году в лаборатории Роллинсона (Англия). От момента появления первых производных 6-АПК до настоящего времени синтезировано большое количество полусинтетических пенициллинов, отличающихся радикалом боковой цепи (по аминогруппе в шестом положении). Многие из них (более 25) нашли применение в клинике. Процесс получения новых производных продолжается до сегодняшнего дня.

Все полусинтетические пенициллины, нашедшие применение в клинической практике, можно разделить на 3 основные группы (С. М. Навашин, И. П. Фомина, 1974б):

- устойчивые к действию стафилококковой β -лактамазы;
- широкого спектра действия;
- устойчивые в кислой среде (в том числе в кислом желудочном содержимом).

Для преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам наибольшее значение имеют пенициллины первой и второй групп (следует учитывать, что среди них многие стабильны

в кислой среде, т. е. формально могли бы быть отнесены и к третьей группе).

К пенициллиназоустойчивым пенициллинам относятся метициллин, оксациллин, клоксациллины (среди последних диклоксациллин нашел применение в отечественной клинической практике) и др. Они наиболее широко используются сегодня для борьбы со стафилококковой инфекцией, вызванной устойчивыми к пенициллину штаммами, особенно в тех случаях, когда заболевание протекает наиболее тяжело. Характеристика этих препаратов детально изложена в ряде опубликованных ранее работ (Hopper et al., 1963; Chain, 1966; С. М. Навашин, 1968; И. П. Фомина и др., 1971; А. Н. Климов, 1973; С. М. Навашин, И. П. Фомина, 1974а, б, и др.). Суммируя, можно выделить следующие основные свойства этих антибиотиков:

- спектр их действия сходен со спектром действия бензилпенициллина, но они устойчивы к стафилококковой β -лактамазе, что определяет их активность в отношении стафилококков, устойчивых к пенициллину;

- при прочих равных условиях, в том числе при действии на чувствительные к пенициллину стафилококки, они в 4–16 раз менее активны, чем бензилпенициллин;

- пенициллиназоустойчивые пенициллины обладают бактерицидным типом действия;

- они, как и пенициллин, могут быть отнесены к малотоксичным антибиотикам, что позволяет использовать большие дозы препаратов;

- оксациллин и клоксациллины устойчивы к действию кислого желудочного содержимого и всасываются из кишечника, что позволяет использовать их не только как парентерально вводимые препараты, но и в виде лекарственных форм для приема через рот;

- как и все пенициллины, они сравнительно быстро выводятся из организма преимущественно почками, однако повторные введения позволяют поддерживать лечебные концентрации в организме.

Перечень заболеваний, при которых пенициллиназоустойчивые пенициллины были с успехом использованы, достаточно велик. По сути дела всякий патологический процесс, в этиологии которого доминирующим фактором является стафилококк, устойчивый к пенициллину, служит показанием для их назначения, если, естественно, нет противопоказаний (например, аллергия к пенициллинам и др.).

Однако уместно вновь вернуться к материалам главы I, где была отмечена возможность распространения так называемых метициллинрезистентных стафилококков. Если в первые годы применения полусинтетических пенициллинов их число не превышало 1%, то в отдельных сообщениях последних лет отмечена возможность более частого выделения подобных штаммов

(до 30%). Устойчивость к метициллину обычно нарастает параллельно с устойчивостью к другим антибиотикам этой группы. Значение отмеченного факта для практики вряд ли стоит преувеличивать. Тем не менее он свидетельствует в пользу того, что клиническое применение пенициллиназоустойчивых пенициллинов не исключает необходимости определения чувствительности стафилококков к антибиотикам, в том числе к пенициллинам.

Важное место в терапии многих заболеваний бактериальной природы заняли полусинтетические пенициллины широкого спектра действия. Среди них основными являются ампициллин и карбенициллин; другие препараты этой группы преимущественно отличаются по некоторым фармакологическим и фармакокинетическим характеристикам, но близки к двум названным пенициллинам по противомикробной активности. Ампициллин (аминобензилпенициллин), один из первых полусинтетических пенициллинов, полученный в 1961 году, активен в отношении стафилококков, чувствительных к пенициллину, цепочковых кокков, нейсерий, клостридий; кроме того, и в этом его принципиальная особенность, он подавляет размножение и жизнеспособность ряда грамотрицательных бактерий — эшерихий, клебсиелл, сальмонелл, шигелл, некоторых видов протеев и др. Карбенициллин также активен в отношении перечисленных микроорганизмов, хотя его подавляющие концентрации несколько больше, чем у ампициллина. Однако он обладает серьезным преимуществом, поскольку к нему чувствительно около 50% штаммов *P. aeruginosa*, а в ряде случаев культуры индолобразующих протеев.

Полусинтетические пенициллины широкого спектра действия, как и другие пенициллины, отличаются сравнительно низкой токсичностью, почему при тяжелых септических процессах допустимо применение весьма больших доз (например, при септикопной сепсисе карбенициллин назначают по 40—70 г в сутки). По характеру действия они бактерицидны; для поддержания лечебных концентраций в организме требуются повторные их введения в течение суток (обычно не менее 3—4).

Ампициллин сравнительно устойчив к действию кислого желудочного содержимого, почему его используют в виде оральной вводимой лекарственной формы. Для лечения тяжелых заболеваний ампициллин обычно вводят парентерально. Карбенициллин разрушается при низких показателях pH, поэтому его применяют только парентерально. Однако в настоящее время синтезирован и клинически апробирован ряд производных обоих препаратов, отличающихся высокой стабильностью в кислой среде, а также большей резорбтивной способностью (Sensi, 1974).

Спектр противобактериального действия и чувствительность к стафилококковой β -лактамазе определили показания к применению ампициллина и карбенициллина в клинике. Ампициллин

имеет большое значение прежде всего при процессах, вызванных грамотрицательными бактериями, особенно эшерихиями, а также при заболеваниях, этиология которых определяется смешанной флорой. Отсюда высокая эффективность ампициллина при перитонитах, возникающих как следствие острых хирургических заболеваний органов живота или как осложнение после обширных операций на кишечнике, когда в патологическом материале обычно доминируют кишечная палочка, энтерококк, клостридии. Этим же определяется значимость ампициллина для терапии холециститов, холецистохолангитов и заболеваний мочевыводящих путей, в этиологии которых важное место занимают грамотрицательные бактерии и т. д. В последние годы наметилась отчетливая тенденция к предпочтительному использованию ампициллина для лечения менингитов, поскольку к нему чувствительны все наиболее частые возбудители менингита — пневмококки, менингококки и палочка инфлюэнцы.

Карбенициллин может быть использован по тем же показаниям, что и ампициллин. Однако он представляет несомненную ценность прежде всего для борьбы с синегнойной инфекцией. По сути дела он единственный малотоксичный антибиотик, пригодный для этой цели. Хотя палочка синезеленого гноя чувствительна к полимиксидам и к некоторым аминогликозидам, повреждающее действие этих антибиотиков на органы слуха и почки человека значительно ограничивает возможность их систематического длительного использования, особенно в больших дозах. В то же время карбенициллин и некоторые сходные с ним по строению и спектру производные 6-АПК отличаются малой токсичностью, почему, как уже отмечалось, при отсутствии противопоказаний возможно их применение в очень больших дозах.

Теперь, после того как дан обзор основных свойств полусинтетических производных 6-АПК, вновь целесообразно подчеркнуть возможности изменения медико-биологических характеристик пенициллина путем химической трансформации его молекулы. Как уже подчеркивалось, все пенициллины отличаются только структурой бокового радикала; если он представляет собой феноксиметил, то пенициллин становится стабилен в кислой среде; замена его на 2,6-диметоксифенил позволяет антибиотику приобрести устойчивость к действию пенициллиназы; введение в молекулу 6-АПК 3-хлорфенил-5-метил-4-изоксазолила делает пенициллин устойчивым и к кислой среде, и к пенициллиназе; альфа-аминобензильный радикал превращает пенициллин в антибиотик широкого спектра действия, устойчивый при кислых показателях pH, но чувствительный к пенициллиназе; α -карбоксибензил также позволяет получить пенициллин широкого спектра действия, активный в отношении псевдомонад, но разрушающийся в кислой среде, однако индонилкарбоксибензилпенициллин стабилен при кислых значениях pH и т. д.

Подобный же метод использован с успехом для получения другой группы эффективных противобактериальных веществ — цефалоспоринов, которые получают на основе малоактивных цефалоспоринов С или 7-аминоцефалоспороновой кислоты, выделенной из антибиотика (Moria et al., 1962).

В настоящее время в клинической практике используют более 15 препаратов этой группы, физико-химические и медико-биологические особенности которых изложены в многочисленных публикациях (Philson et al., 1964; Hermans et al., 1965; Ott et al., 1967; Diakos et al., 1970; Nishida et al., 1970; А. Н. Климов, 1973; Sensi, 1974; Hamilton-Miller et al., 1974; Garrod, 1974) и др.

Для борьбы с микробной флорой, устойчивой к антибиотикам, длительно используемым в медицинской практике, очевидно, прежде всего важны такие их свойства, как широкий противомикробный спектр действия и устойчивость к стафилококковой β -лактамазе (известно, что цефалоспорины, как и пенициллины, имеют в молекуле β -лактамное кольцо). Спектр действия цефалоспоринов включает стафилококки, цепочковые кокки, клостридии, нейсерии, эшерихии, некоторые капсульные бактерии, бактероиды. Различают среди цефалоспоринов стабильные и не стабильные в кислом желудочном содержимом, почему цефалоридин и цефалотин вводят только парентерально, а цефалексин и цефалоглицин — через рот. Чувствительность микробов к цефалоспориновым антибиотикам весьма отлична. Например, МПК первых двух названных препаратов для подавляющего большинства бактериальных культур в 2—8 раз меньше МПК двух других. Сравнение активности наиболее длительно применяемого в клинической практике цефалотина с действием цефамандола, цефатризина и цефокситина показало, что МПК последних для энтеробактерий, в том числе устойчивых к цефалотину, были в 8—32 раза меньшими и что реально получение таких производных 7-АПК, которые действовали бы на резистентные к другим цефалоспорином штаммы (Lewis et al., 1976).

Накоплен большой опыт применения цефалоспоринов в клинике; достаточно широко эффективность цефалоридина изучена в нашей стране. Полученные данные позволяют положительно оценить лечебные свойства этой группы антибиотиков. Широкий спектр и бактерицидный характер действия, относительно низкая токсичность, сравнительно узкий круг противопоказаний к применению определили значительный интерес к ним врачей. В то же время несомненно, что предстоит еще большая работа, прежде чем среди уже очень большого круга β -лактамных антибиотиков, применяемых в клинике, удастся выявить наиболее рациональные по сочетанию противомикробных, токсигенных и фармакологических свойств. Для обсуждаемой темы интересен и сам факт пластичности молекулы цефалоспоринов.

Молекула 7-АЦК имеет 3 активные группировки (Sensi, 1974). Присоединение различных структур к каждой из них позволяет получить вещество с новыми свойствами, среди которых могут быть интересные в научном и перспективные в практическом отношении. Следует согласиться с мнением тех исследователей, которые полагают, что возможности модификации β -лактамов антибиотиков еще далеко не исчерпаны.

Другой, чрезвычайно интересной группой антибиотиков, противомикробное действие которых зависит от изменений определенных структурных единиц молекулы, являются рифамицины. Исходный антибиотик рифамицин В малоактивен по противомикробным свойствам. Однако он легко окисляется в активный рифамицин О, последний гидролизует в рифамицин С, из которого восстановлением получают рифамицин СВ. Этот антибиотик применяют в клинике. Из рифамицина СВ путем химической трансформации получают 3-(4-метил-1-пиперазинил-иминометил)-рифамицин СВ, широко известный как рифампицин (бенемицин, римактан, рифадин). По механизму своего противобактериального действия рифамицины существенно отличаются от остальных антибиотиков: они угнетают синтез внутриклеточного белка, блокируя процесс транскрипции благодаря связыванию с ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Своеобразно, что подобное действие проявляется только в отношении фермента прокариотов.

Рифамицин СВ активен главным образом в отношении грамположительных бактерий (стафилококков, стрептококков, пневмококков, клостридий и др.) и грамотрицательных диплококков. Энтерококки гетерогенны по чувствительности к антибиотикам. Рифамицин СВ угнетает размножение микобактерий туберкулеза, причем многие штаммы чувствительны к малым его концентрациям (менее 1 мкг/мл).

Полусинтетическое производное рифамицина СВ, рифампицин, является антибиотиком широкого спектра действия. К нему чувствительны стафилококки, стрептококки, нейсерии, пневмококки, клостридии, эшерихии, многие штаммы клебсиелл, отдельные культуры других грамотрицательных бактерий. Подавляющие концентрации рифампицина для микобактерий туберкулеза измеряются десятками и сотыми долями микрограмма. К нему чувствителен возбудитель проказы.

В настоящее время накоплен большой объем экспериментально-клинических наблюдений, свидетельствующих о высокой эффективности рифамицинов при инфекциях, вызванных различными видами микроорганизмов, в том числе устойчивыми к ряду других антибиотиков (Bergamini et al., 1965; Pallanza et al., 1965; Knüzel, 1968; Brickner, 1969; Binda et al., 1971; Schnell et al., 1972; В. А. Шорин, С. П. Шаповалова, 1974, и др.). Рифамицин СВ в силу его нестабильности в кислом желудочном содержимом применяют парентерально; рифампицин не разру-

шается желудочным соком, поэтому его преимущественно вводят через рот, хотя имеются препараты и для парентерального введения.

Среди рифамицинов наибольшего внимания несомненно заслуживает рифампицин, обладающий рядом интересных и важных в практическом отношении свойств, в том числе:

- широтой противобактериального спектра действия, включая активность в отношении микобактерий;

- способностью хорошо всасываться из желудочно-кишечного тракта и длительно (до 24—48 ч после однократного приема) поддерживать лечебные концентрации в крови;

- малой токсичностью; только печень в силу того, что антибиотик выводится из организма преимущественно с желчью, при длительном использовании его больших доз относительно часто (но не более чем в 1,5% наблюдений) дает обратимое нарушение функций, быстро проходящее после отмены препарата;

- несомненной эффективностью при процессах, вызванных чувствительной к рифампицину флорой.

Рифамицин СВ и рифампицин нашли широкое применение при инфекциях нетуберкулезной природы, однако особое значение придается рифампицину как средству терапии туберкулеза человека. Для этого имеется много предпосылок, включая чувствительность возбудителя, возможность длительного введения без риска вызвать серьезные необратимые изменения в органах, достижимость лечебных концентраций при приеме препарата один раз в день или даже один раз в два дня, оральный путь введения, хорошая переносимость, совместимость с другими противотуберкулезными лекарственными веществами и др. Вместе с тем отмечено, что в процессе терапии возможно быстрое появление рифамициноустойчивых штаммов; это резко снижает эффективность антибиотика. В отдельных сообщениях показана возможность появления устойчивых вариантов туберкулезной палочки и других микроорганизмов уже в течение первой недели лечения рифампицином. Подобное обстоятельство является серьезным основанием для строго ограниченного, продуманного использования антибиотика, особенно при терапии нетуберкулезных процессов. Таким образом, рифамицины также дают интересный пример возможности радикального изменения свойств антибиотика путем химической трансформации его молекулы; свойства изменялись в направлении от неактивного препарата (рифамицин В) к антибиотику широкого спектра действия, обладающего своеобразными фармакокинетическими свойствами.

Особенности механизма действия рифамицинов, их активность в отношении крупных вирусов побудили ученых направленно искать такие производные антибиотики, которые обладали бы противовирусным и противоопухолевым действием,

в частности путем блокады обратной транскриптазы. Очевидная теоретическая предпосылка такой постановки вопроса в настоящее время подкреплена определенными экспериментальными данными, полученными на основе испытаний некоторого числа новых препаратов. Однако практическая оценка их принадлежит будущему.

Аминогликозидные антибиотики являются объектом систематического изучения. Ведется поиск новых антибиотиков этой группы; синтезируются многочисленные препараты на основе уже известных. Эти работы преследуют две основные цели: получение лекарственных веществ, активных в отношении штаммов, резистентных к аминогликозидам, и снижение токсичности антибиотиков: их ототоксическое и нефротоксическое действие резко сужает возможность клинического использования. Успехи в изыскании или синтезе малотоксичных препаратов пока оказались скромными, и обсуждение этих материалов в настоящей работе не целесообразно. Значительно больше сделано в области получения аминогликозидных антибиотиков, отличающихся высокой активностью и способностью подавлять некоторые виды микроорганизмов, которые были устойчивы к другим препаратам этой группы.

В отечественной клинической практике к настоящему времени нашли применение неомицин В, который в силу его ототоксичности обычно применяют только местно или через рот (препарат практически не всасывается из желудочно-кишечного тракта), мономицин, канамицин, гентамицин и стрептомицин, применяемые внутримышечно, внутрь или местно. Спектр действия перечисленных антибиотиков практически сходен; основное их преимущество перед многими другими антибиотиками заключено в активности в отношении многих грамотрицательных бактерий: эшерихий, клебснелл, сальмонелл, протеев (индолотрицательных и применительно к половине штаммов индолположительных) и др. Особо выделяют гентамицин, к которому чувствительны многие штаммы палочки синезеленого гноя. Проблемой последних лет стал рост числа устойчивых к перечисленным антибиотикам штаммов. Поскольку существует перекрестная устойчивость к аминогликозидам, определяемая общим механизмом их энзиматической инактивации, была поставлена во многом решенная задача найти или синтезировать такие вещества, которые, сохранив противомикробные свойства аминогликозидов, были бы устойчивы к действию ферментов. Среди интересных и перспективных заслуживают упоминания тобрамицин, амикацин, сизомицин; из них амикацин является продуктом химической трансформации 2-дезоксистрептамина канамицина.

Известно, что инактивация канамицинов А, В и С *E. coli*, несущей R-фактор, и устойчивыми *Pseudomonas* обусловлена специфическим энзиматическим фосфорилированием антибиотиков

при С-3-гидроксильной группе 6-амино-6-дезоксид-глюкозы, 2,6-диамино-2,6-дидезокси-Д-глюкозы и 2-амино-2-дезоксид-глюкозы соответственно (Umezawa et al., 1971). Некоторые штаммы резистентных к канамицину *E. coli* инактивируют канамицин А в результате ферментического N-ацетилирования аминогруппы 6-амино-6-дезоксид-глюкозной части (Umezawa et al., 1967a). Активность канамицина В, содержащего 2,6-диамино-2,6-дидезокси-Д-глюкозу, значительно снижается вследствие такого ферментического N-ацетилирования. Функциональность С-3'-гидроксильной группы канамицинов оказывает решающее воздействие на антибактериальную активность антибиотика. Показано, что 3'-О-метилканамицин почти лишен антибактериальной активности (Umezawa et al., 1972). Это позволяет предполагать, что маскировка С-3'-гидроксила может оказаться препятствием для связывания антибиотика с рибосомами бактерий. В связи с этим был синтезирован 3'-дезоксиканамицин А, в котором О-3'-гидроксильная группа заменена водородом. Было найдено, что это синтетическое дезоксипроизводное канамицина А обладает антибактериальной активностью, сходной с таковой исходного антибиотика, и, кроме того, оказывает заметное ингибирующее действие на резистентные бактерии (Umezawa et al., 1971; Umezawa et al., 1972).

Сходная тенденция наблюдалась и в случае с 3'-О-метилнеамином. Сравнение активности 3'-О-метилнеамина с таковой 4'-О-метилнеамина обнаружило, что блокирование С-4'-гидроксильной группы метилом также вызывает значительное снижение активности, но оно было меньше наблюдаемого в случае с 3'-О-метилнеамином. К тому же блокировка С-4'-гидроксила не приводила к проявлению какой-либо активности в отношении устойчивых *E. coli*, тогда как 3'-О-метилнеамин становился слегка активным против резистентных бактерий (Umezawa et al., 1972).

Далее, Umezawa et al. (1972) разработали химический метод удаления С-3'- и С-4'-гидроксильных групп в канамицине В через диметилпроизводное, которое при обработке йодистым натрием и цинковой пылью в диметилформамиде дает ненасыщенное производное (Umezawa et al., 1971). Последующее гидрирование, а затем деблокировка привели к образованию 3', 4'-дидезоксиканамицина В. Этот полусинтетический антибиотик показал заметную антибактериальную активность в отношении резистентных бактерий, включая несущих R-фактор *E. coli* и *P. aeruginosa*. 3', 4'-Ненасыщенный канамицин В также показал довольно высокую антибактериальную активность против резистентных бактерий, но ненасыщение вызывало общее снижение антибактериальной активности. 3', 4'-Дидезоксинеамин, полученный из неамина в результате аналогичной последовательности реакций, также оказался активным в отношении устойчивых бактерий.

Производное канамицина, названное ВВ-КВ или амикацин, (Koyama et al., 1968), было получено из канамицина А посредством С-1-ацилирования с использованием L(-)-4-амино-2-оксимасляной кислоты (НАВА), аминокислотного заместителя бутирозина и оказалось активным против различных штаммов резистентных и чувствительных бактерий.

6'-N-Метилканамицин и 3'4'-дидезокси-6'-N-метилканамицин В, полученные Umezawa et al. (1972), продемонстрировали активность в отношении резистентных бактерий, образующих вышеуказанный N-ацетилирующий фермент.

Открытие бактериального антибиотического комплекса бутирозина, ацилированного производного рибостамицина или его ксилолилового изомера, позволило говорить о новом типе химической модификации аминогликозидных антибиотиков. Сравнение бутирозина с рибостамицином показывает, что ацилирование рибостамицина L(-)-γ-амино-α-оксимасляной кислотой (L-НАВА) при С-1-аминогруппе дезоксистрептаминовой части обеспечивает получение более эффективного антибиотика, подавляющего некоторые микроорганизмы, устойчивые к аминогликозидным антибиотикам.

На основе знания энзиматических механизмов устойчивости можно предсказать структуру соединений, не претерпевающих ферментного расщепления. Например, удаление 3'-гидроксильной группы дало в результате эффективные соединения: 3'-дезоксиканамицин А (Umezawa et al., 1971), 3'-дезоксиканамицин В (Takagi et al., 1973), 3'-дезоксирибостамицин (Ikeda et al., 1973b), 3', 4'-дидезоксиканамицин В (Umezawa et al., 1971), 3', 4'-дидезокси-6'-N-метилканамицин (Umezawa et al., 1972), 3', 4'-дидезоксирибостамицин (Umezawa et al., 1972), 3', 4'-дидезоксибутирозин В (Ikeda et al., 1973a) и 3', 4'-дидезоксинеоамин (Umezawa et al., 1972), которые обладают антибактериальной активностью и ингибируют резистентные организмы, образующие канамицин-неомицин-фосфотрансферазы.

Как отмечали Daniels et al. (1974), удаление из гентамицина С2''-гидроксильной группы дает производное, устойчивое к действию гентамицин-канамициновой нуклеотидилтрансферазы и подавляющее резистентные микроорганизмы.

Из производных ливидомицина наиболее интересную активность, выражающуюся в ингибировании некоторых резистентных штаммов *P. aeruginosa*, проявляет 6'-амино-6'-дезоксиливидомицин В (3'-дезоксинеомицин В).

Таким образом, химическая трансформация аминогликозидных антибиотиков, направленная на преодоление энзиматических механизмов устойчивости, дает активные соединения, полезные для борьбы с резистентными штаммами.

Чем характерны медико-биологические свойства природных и полученных путем полусинтеза аминогликозидных антибиотиков? Наиболее детально изучен тобрамицин, опыт его экспери-

ментального и клинического использования достаточно велик. Спектр действия препарата сходен со спектром действия других антибиотиков этой группы, однако он активен в отношении псевдомонад, в том числе устойчивых к неомицину и гентамицину. Его подавляющие концентрации колеблются в пределах от 0,25 до 1,5 мкг/мл, что значительно меньше тех концентраций, которые достижимы в крови человека при использовании лечебных доз антибиотика. МПК тобрамицина для других видов микроорганизмов существенно не отличаются от этого же показателя неомицина и гентамицина. Мнения о возможности перекрестной устойчивости к тобрамицину и другим аминогликозидам противоречивы. Во всяком случае чаще она представляется реальной, хотя возможно, что отдельные штаммы стафилококка и грамотрицательных бактерий, устойчивые к неомицину, паромомицину (мономицину) или гентамицину, могут сохранить чувствительность к тобрамицину. Это вполне объяснимо различием по субстратоспецифичности тех ферментов, которые разрушают антибиотики данной группы. Оценка достаточно многочисленных исследований нефро- и ототоксического, а также курареподобного действия тобрамицина не дает основания видеть какие-либо его преимущества по сравнению с другими аминогликозидами; существенно не отличается он и по характеру фармакокинетики в организме.

Широкое клиническое применение тобрамицина показало его эффективность при ряде инфекционных заболеваний, среди которых следует выделить процессы, вызванные палочкой синезеленого гноя.

Значительно больше преимуществ имеет амикацин, спектр действия которого включает палочку синезеленого гноя и устойчивость к которому микроорганизмов редко проявляется при устойчивости их к другим аминогликозидам.

Действие ряда ферментов — трансфераз не разрушает амикацина, хотя они активны в отношении других антибиотиков, включая неомицин, канамицин, гентамицин. По противобактериальной активности амикацин не имеет преимуществ в тех случаях, когда флора чувствительна и к другим аминогликозидам; более того, его МПК могут быть даже несколько большими; однако по действию на резистентные микроорганизмы он явно предпочтителен. По действию на органы слуха и почки амикацин сходен с канамицином; тем не менее следует учитывать, что оба названных препарата обладают меньшим повреждающим действием, чем неомицин, мономицин или гентамицин.

В настоящее время накоплен достаточный опыт, свидетельствующий об эффективности амикацина при тяжелых инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями, включая палочки синезеленого гноя, и стафилококками. Он особо показан в случаях устойчивости возбудителя к канамицину и гентамицину.

Таким образом приведенные материалы еще раз подтверждают возможность использования новых аминогликозидных антибиотиков для борьбы с устойчивой к другим препаратам флорой.

Неоднократно предпринимались попытки получить путем химической трансформации хлорамфеникола (левомицетина) такие его производные, которые были бы активны в отношении резистентных к нему штаммов.

Как полагают, устойчивость левомицетина к воздействию хлорамфениколацетилтрансферазы обусловлены заменой гидроксильной группировки у C_3 пропандиольной цепи молекулы антибиотика (Ю. О. Сазыкин, 1972).

Изучали антибактериальную активность 146 производных и аналогов хлорамфеникола, используя как тест-микроб устойчивый к антибиотику штамм *S. aureus*. Установлено, что 17 из испытанных соединений имели одинаковую или более высокую по сравнению с хлорамфениколом эффективность, их минимальные подавляющие концентрации были значительно меньше, чем у исходного антибиотика. Проведенные исследования показали, что наиболее активным из производных соединений был DL-дихлорацетамидоальфа-метилен-*p*-нитропропиофенон. Механизм антибактериальной активности этого соединения был обусловлен тем обстоятельством, что он не инактивировался хлорамфениколацетилтрансферазой, образуемой устойчивым к хлорамфениколу штаммом. Однако ни одно из этих соединений пока не нашло практического использования. Значительно более перспективным оказалось получение *O*-ацильных производных хлорамфеникола; эти исследования позволили получить водорастворимые препараты, пригодные для парентерального применения (Conzilio et al., 1958). Большинство стран выпускает полуэфир левомицетина и янтарной кислоты (сукцинат левомицетина). Его своеобразие заключается в том, что в пробирочных опытах он малоактивен (МПК в 20—40 раз больше, чем МПК левомицетина), однако после введения в организм препарат гидролизует с высвобождением активного левомицетина. Спектр противобактериального действия сукцината левомицетина полностью совпадает со спектром действия исходного антибиотика, на резистентные варианты бактерий он не действует. Преимущество препарата заключено в возможности парентерального использования, в частности эндолумбального, что в ряде случаев бывает необходимо. Многочисленные клинические наблюдения, в том числе при терапии отечественным левомицетином сукцинатом, показали его эффективность при процессах, вызванных чувствительной к левомицетину флорой, особенно при перитонитах, бактериальных менингитах, заболеваниях мочеполовой сферы и других. Однако эффективность препарата резко снижалась, если бактериальная флора была устойчива к антибиотику. Наиболее интересен факт проникновения пре-

параг
гитом.
ганзм
БВ
in vivo
малы
проти
в нап
сущес
или ж

№	п. п.
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	

Та
орга
в них
стно,
ляющ
в кр
в орг
нию
ным
ткан
прост
непр
числе
В
прак
лые
Посл
в ме
боль
инте

парата через гемато-энцефалический барьер у больных менингитом, что связывают с парентеральным его введением в организм.

Важным элементом повышения эффективности антибиотиков *in vivo* является возможность создания и поддержания максимальных концентраций их в крови. В идеале уровень содержания противомикробного вещества в организме должен обеспечивать в наибольшей степени подавление возбудителя при полном отсутствии повреждающего действия на ткани и системы человека или животного.

ТАБЛИЦА 24

Аминометильные производные тетрациклинов

№ п. п.	Фирменное название	Химическое название	Фирма и страна
1	Reverin	Пирролидинметилтетрациклин	Hoechst, ФРГ
2	Velocyclin	То же	Squibb, США
3	Syntodecin	»	Astra, Швеция
4	Syntetrin	»	Bristol, США
5	Морфоциклин	Морфолинметилтетрациклин	СССР
6	Гликоциклин	Глицинметилтетрациклин	СССР
7	Ambravena	N-оксиэтил-N-пиперазинметилтетрациклин	Lepetit, Италия
8	Tetralysal	Лизинметилтетрациклин	Erba, Италия
9	Tetran	Пирролидинметилокситетрациклин	Chinoïn, Венгрия

Такие понятия, как чувствительность или устойчивость микроорганизма к антибиотикам, в том смысле, какое вкладывают в них химиотерапевты, являются довольно условными. Как известно, для этого прибегают к сопоставлению минимальных подавляющих концентраций и тех концентраций, которые достижимы в крови больного. Поэтому всякое повышение концентрации в организме может в той или иной степени привести к преодолению устойчивости. Применительно к антибиотикам, малотоксичным и не оказывающим повреждающего действия на мягкие ткани (например, пенициллинам), вопрос решается часто путем простого увеличения дозы препарата. Однако этот путь оказался неприемлемым при использовании ряда антибиотиков, в том числе тетрациклинов и макролидов.

В течение значительного промежутка времени в клинической практике использовали основания тетрациклинов или солянокислые их соли, которые вводили через рот или внутримышечно. Последний путь введения в силу выраженной болезненности в месте инъекций препаратов позволял использовать лишь небольшие дозы антибиотиков. Это явилось одной из причин интенсивного поиска новых производных тетрациклинов, которые

можно было бы вводить внутривенно. Среди них прежде всего заслуживают упоминания карбоксамидные производные тетрациклинов, некоторые из них вошли в медицинскую практику (табл. 24).

В нашей стране широко применяют морфолинметилтетрациклин (морфоциклин).

ТАБЛИЦА 25

Сравнительная эффективность тетрациклинов при стрептококковом сепсисе

Антибиотик	Путь введения	Течение стрептококкового сепсиса у белых мышей		
		легкое ЕД ₁₀₀	средней тяжести ЕД ₅₀	тяжелое ЕД ₂₀
Морфоциклин (мг/кг) . . .	Внутривенно	6	17	40
Пирролидинметилтетрациклин (мг/кг)	»	5,5	25	50
Тетрациклин (мг/кг)	Орально	21,5	25	50

ТАБЛИЦА 26

Сравнительная эффективность тетрациклинов при экспериментальной инфекции, вызванной *Cl. perfringens*

Антибиотик	Путь введения	Доза, ЕД/мышь	Всего мышей	Выжило	Погибло				Средняя продолжительность жизни, сут
					всего	1-е сутки	2-е сутки	3-7-е сутки	
Морфоциклин	Внутривенно	75	18	16	2	1	—	1	18,0
		18,8	18	13	5	—	—	5	9,3
		6,0	18	8	10	3	5	2	2,9
Тетрациклин солянокислый	Внутримышечно	300	18	12	6	3	1	2	9,5
		75	18	8	10	5	3	2	2,6
		18,8	18	7	11	8	—	3	2,1
Тетрациклин основание	Внутрь	300	18	10	8	3	4	1	3,4
		75	18	7	11	4	6	1	2,4
		18,8	18	2	16	11	4	1	1,4
Контроль			30	0	30	25	4	1	1,1

Морфоциклин по своему противобактериальному спектру не отличается от тетрациклина, однако его внутривенное введение обусловило преимущественную активность при ряде модельных инфекций (стафилококковой, клостридной, стрептококковой, колибациллярной, дизентерийной) по сравнению с эффективностью препаратов, вводимых орально или внутримышечно (А. В. Маркович и др., 1964; М. С. Поляк, 1968; М. Д. Пайкин, 1970).

Морфоциклин не уступал в этом отношении пирролидинметилтетрациклину (табл. 25, 26). Изучение фармакокинетики морфоциклина показало, что он создает в организме экспериментальных животных значительно большие концентрации, чем препараты, вводимые внутримышечно или орально (табл. 27).

Было отмечено, что морфоциклин лучше, чем тетрациклин, проникает в макрофаги (О. Н. Экземпляров, 1965). Он меньше других тетрациклинов связывается белками сыворотки крови.

ТАБЛИЦА 27

Концентрация морфоциклина, тетрациклина гидрохлорида и тетрациклина основания в крови кроликов при дозе 30 000 ЕД/кг

Антибиотик	Путь введения	Концентрация, ЕД/мл			
		30 мин	1 ч	2 ч	4 ч
Морфоциклин	Внутривенно	34,4	28,3	13,7	8,1
Тетрациклин гидрохлорид	Внутримышечно	2,1	4,9	2,9	2,7
Тетрациклин основание	Внутрь	0	Следы	Следы	Следы

Продолжение табл. 27

Антибиотик	Путь введения	Концентрация, ЕД/мл			
		6 ч	12 ч	24 ч	48 ч
Морфоциклин	Внутривенно	6,5	3,5	0,8	Следы
Тетрациклин гидрохлорид	Внутримышечно	1,6	1,0	0,8	0,8
Тетрациклин основание	Внутрь	Следы	Следы	0	0

Особую ценность для травматологии представляет его способность высоко концентрироваться в костной ткани (С. С. Ткаченко и др., 1973; И. Д. Косачев, 1970).

Морфоциклин был широко изучен в клинических условиях при тяжелых заболеваниях бактериальной природы (пневмония, перитонит, сепсис и др.). Во всех случаях оценка лечебных свойств препарата была достаточно велика; особенно выделены его лечебные возможности при инфекционной патологии органов дыхания (Ф. Г. Углов и др., 1967а, б).

А. М. Марголин и М. Д. Пайкин (1966) сообщили о применении морфоциклина у больных нагноительными процессами в легких. Наблюдаемые ими больные до назначения морфоциклина получали различные антибиотики, в том числе антибиотики группы тетрациклина. Отсутствие эффекта от предшествующей

антибиотикотерапии служило основанием для назначения морфоциклина, который и дал положительный клинический эффект.

И. К. Лагерт и др. (1969) изучали действие морфоциклина у больных с острой почечной недостаточностью, сочетающейся с сепсисом. Несмотря на значительную устойчивость выделенной микрофлоры к тетрациклиновым антибиотикам, лечение морфоциклином оказалось эффективным.

Г. П. Мясниковой (1969) было изучено действие водорастворимых тетрациклинов, в том числе морфоциклина, при септических пуэрперальных заболеваниях. Устойчивость к нему отмечена в 29,8% наблюдений. Лечение было успешным у большинства больных, лишь в 1,7% случаев оно оказалось неэффективным и потребовало смены антибиотика.

Касаясь применения морфоциклина в брюшной хирургии, Ф. Г. Углов с соавт. (1967б) отмечали, что хотя к тетрациклинам чувствительно только около 60% выделяемых бактерий, однако большие концентрации антибиотика, создаваемые с помощью внутривенно вводимого морфоциклина, обеспечивают бактериостатическое действие даже в тех случаях, когда флора малочувствительна к тетрациклинам.

В работе Т. В. Луначарской и И. П. Копейко (1968) по интратрахеальному применению морфоциклина указано, что у подавляющего большинства больных уже при поступлении в клинику наблюдается устойчивость флоры, выделяемой из мокроты или гноя, к пенициллину, стрептомицину, левомецетину, полимиксину, довольно часто — к тетрациклину. При применении морфоциклина даже у больных, у которых наблюдалась устойчивость к нему как кокковой, так и грамотрицательной флоры, был получен положительный клинический эффект. Авторы объясняют это изменением характера микрофлоры и чувствительности к антибиотикам, подавлением одного из компонентов микробной ассоциации, что связано со значительным повышением концентрации препарата в очаге поражения.

В работах, посвященных ингаляционному применению морфоциклина, также отмечается его действие на резистентные микроорганизмы.

С. Я. Кофман и др. (1967), изучая эффективность лечения ингаляциями морфоциклина легочных больных, показали, что, несмотря на то, что резистентные штаммы к антибиотикам тетрациклиновой группы составляли 35,5—54,6%, терапевтическая эффективность ингаляций морфоциклина имела место у больных острыми пневмониями как с чувствительной, так и с устойчивой микробной флорой к антибиотикам тетрациклинового ряда. Хорошие результаты были получены в связи с высокой и постоянной концентрацией антибиотика как в мокроте, так и в крови больных.

Аналогичные данные были получены П. К. Булатовым с соотр. (1968), которые отмечали, что, «несмотря на устойчивость в ряде

случаев флоры
аэрозолем мор
подавление (ч
почечной палоч
объяснить соз
кроте».

Другим от
ляется оксиге
формации о
к числу наин
ляется свойс
ства) и введ
щей метилгл
активным ве
ненко, 1972)

от окситетр
эксперимент
к тетрацикл
в частности
стафилокок
эффективне
рациклина
ния). Пре
нима особ
с морфоци
большие
ных, чем
циклин об
как и ря
(табл. 28
кую эфф
ной к ок
ных про
при ран
вводят е

Повы
быть до
Особый
со стру
тилент
В о
С6 окс
бильно
новых
прове
1961)
автор
цикли

случаев флоры к тетрациклинам, в процессе антибиотикотерапии аэрозолем морфоциклина у большинства больных наблюдалось подавление (частичное или полное) роста бактерий группы кишечной палочки, стафилококков и других микробов, что можно объяснить созданием высоких концентраций препарата в мокроте».

Другим отечественным карбоксамидным производным является оксиглюкоциклин, созданный путем химической трансформации окситетрациклина. Препарат может быть отнесен к числу наименее токсичных среди тетрациклинов, что определяется свойствами самого окситетрациклина (исходного вещества) и введением в его молекулу в качестве аминосоставляющей метилглюкозамина. Последний близок к физиологически активным веществам, входящим в состав тканей (Т. С. Харитonenko, 1972). Препарат по спектру своего действия не отличается от окситетрациклина и, введенный внутривенно, активен при экспериментальных инфекциях, вызванных чувствительными к тетрациклину штаммами (Т. С. Куплевацкая, 1970). Показано, в частности, что оксиглюкоциклин, введенный внутривенно, при стафилококковой, колибациллярной и клостридной инфекциях эффективнее препаратов, вводимых внутримышечно (окситетрациклина гидрохлорида) и орально (окситетрациклина основания). Преимущественная активность оксиглюкоциклина объяснима особенностями его фармакокинетики; как и в опытах с морфоциклином, он при внутривенном введении обеспечивал большие концентрации в организме экспериментальных животных, чем другие препараты. Следует отметить, что оксиглюкоциклин обеспечивает такое же содержание антибиотика в крови, как и ряд других препаратов, широко известных за рубежом (табл. 28). Клиническое изучение препарата показало его высокую эффективность при заболеваниях, вызванных чувствительной к оксиглюкоциклину флорой, в том числе при воспалительных процессах в легких, органах живота, мочевыводящих путях, при раневой инфекции и др. Препарат разрешен к применению, вводят его не только внутривенно, но и внутримышечно.

Повышение концентрации тетрациклинов в организме может быть достигнуто не только за счет их парентерального введения. Особый интерес за последние годы приобрели их производные со структурными изменениями в положении C₆, среди них 6-метилентетрациклины и 6-деокситетрациклины.

В отличие от ферментационных тетрациклинов, имеющих при C₆ окси-группы, их 6-деоксипроизводные обладают большой стабильностью в кислой среде. Это дало возможность получить ряд новых активных производных. Подробные исследования были проведены группой американских ученых (Blackwood et al., 1961) на основе 6-деметил-6-деокситетрациклина. Полученные авторами данные говорят о том, что многие производные тетрациклинов обладают антибактериальной активностью и могут,

ТАБЛИЦА 28

несомненно кислотоустойчивый препарат в сравнении с раствором соляной кислоты. В дощечном и дощичном изменении 6-метилленпрепарат Препарат от окисления антраценому дожно-кишечному Последнее 300 мг антрацена в крови, которое до его соляного 6-Мет

значения
чения др
6-деоксит
также ис
хорошим
чествам,
самым у
тиков. О
рондомин
этого вы
центраци
дения. С
чен спе
несколько
в 2 раза
резистен
даст. Гл
поддерж
Доксици
200—25
3,4 мкг
рых др.
(Бо и
В кровя
около 1
нов Окс
вали.
к ткан
Послед
сорбции
РН мо

несомненно, представлять практический интерес. Кроме того, кислотоустойчивость 6-деокситетрациклинов и их производных расширяет возможности перорального применения этих препаратов в связи с их индифферентностью к кислой реакции желудочного содержимого. Некоторые из этих веществ нашли применение в клинической практике. Одно из этих производных — 6-метилен-5-гидрокситетрациклин (метациклин, рондомицин). Препарат не отличается по спектру противомикробного действия от окситетрациклина и не действует на резистентные к исходному антибиотику штаммы, но он хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта и медленно выводится из организма. Последнее свойство делает достаточным двукратный прием 300 мг антибиотика в день. Концентрации, достигаемые при этом в крови, близки или превышают то содержание антибиотика, которое достижимо при приеме окситетрациклина основания или его солянокислой соли в суточной дозе 2 г.

6-Метилентетрациклины, кроме большого самостоятельного значения, являются еще промежуточными продуктами для получения другого класса чрезвычайно интересных антибиотиков — 6-деокситетрациклинов, в частности доксициклина, который также используют в медицинской практике. Благодаря своим хорошим антимикробным, фармакологическим и химическим качествам, он привлек большое внимание. Доксициклин является самым устойчивым в кислой среде из тетрациклиновых антибиотиков. Он обладает всасываемостью значительно лучшей, чем рондомицин, медленно экскретируется из организма и в силу этого высокоэффективен, хотя для достижения лечебных концентраций препарата в крови достаточно однократного его введения. Спектр действия доксициклина (вибрамицина) аналогичен спектру действия окситетрациклина, однако его МПК несколько меньше, чем у исходного антибиотика (чаще в 2 раза). Заметным преимуществом по активности в отношении резистентных к тетрациклинам штаммов доксициклин не обладает. Главное его свойство — способность создавать и длительно поддерживать высокие концентрации в организме человека. Доксициклин был найден в крови после однократного приема 200—250 мг препарата в концентрациях (максимально) до 3,4 мкг/мл, чего не удалось достигнуть при введении некоторых других антибиотиков тетрациклиновой группы внутривенно (Бо и др., 1974; Виттенау, 1974). Концентрация доксициклина в крови через сутки от момента приема была значительной — около 1 мкг/мл, в то время как содержание других тетрациклинов оказалось в 3—8 раз меньшим или их вообще не обнаруживали. Полагают, что доксициклин имеет большее сродство к тканям млекопитающих, что связано с его липофильностью. Последняя особенность препарата может объяснить и его реабсорбцию после фильтрации через клубочки почек при изменении рН мочи в кислую сторону (Виттенау, 1974). Многочисленные

клинические наблюдения позволили считать доксициклин достаточно эффективным и весьма удобным лекарственным средством, хорошо переносимым больными, редко вызывающим побочные эффекты. Верно, нарушение экскреторной функции почек чревато быстрым накоплением препарата в крови и тканях, почему при тяжелой патологии паренхимы почек его применяют с осторожностью.

Говоря об определенных преимуществах доксициклина, следует отметить, что для борьбы с устойчивостью микроорганизмов к тетрациклинам имеют значение не только его фармакокинетические свойства (хотя они могут быть признаны ведущими), но и способность, правда не очень значительная, подавлять в меньших концентрациях жизнедеятельность микроорганизмов.

Одним из практически важных результатов химического превращения молекулы ранее известных антибиотиков является выявленное в отдельных случаях повышение их активности, т. е. способности проявлять свое бактериостатическое или бактерицидное действие в заметно меньших концентрациях. В мировой клинической практике известно несколько препаратов подобного рода. Перспективным с этой точки зрения представляется производное тетрациклина с двумя диметиламинными группировками в молекуле — миноциклин.

Миноциклин, или 7-диметиламино-6-дезоксиг-6-диметилтетрациклин, обладает по сравнению с природными веществами этой группы значительно более высокой антибактериальной активностью. В частности, это проявляется при сравнении действия миноциклина и природных тетрациклинов на клинические тетрациклинорезистентные штаммы микроорганизмов: миноциклин может быть в 5—10 раз активнее других тетрациклинов.

Ю. О. Сазыкин с соавт. (1975) на основании изучавшихся ими ранее конкурентных взаимоотношений между миноциклином и C^{14} -окситетрациклином при их проникновении в клетку *E. coli* сделали предположение о наличии дополнительных систем переноса миноциклина через оболочку клетки, не исключая при этом возможности повышенной активности миноциклина как ингибитора рибосомных функций. Как показали опыты с целыми клетками, миноциклин не отличался какими-либо особенностями в отношении воздействия на синтез белка и нуклеиновых кислот в клетке от природных тетрациклинов, т. е. быстро подавлял синтез белка и значительно медленнее воздействовал на синтез нуклеиновых кислот. Авторами было проведено сравнение активности окситетрациклина и миноциклина как ингибиторов полипептидного синтеза (в бесклеточной системе синтеза полифенилаланина). Выяснилось, что оба препарата обладали довольно близкой ингибирующей синтез полифенилаланина активностью. Такого рода результаты косвенно подтверждают сделанное предположение о том, что большая активность миноциклина по сравнению с активностью окситетрациклина в отношении чув-

ствительных и резистентных к тетрациклинам штаммов может быть обусловлена определенными особенностями проникновения первого через оболочку клетки, поскольку существенных отличий между окситетрациклином и миноциклином на стадии их фиксации конечным внутриклеточным акцептором — рибосомой — не было выявлено.

В последние годы значительное внимание клиницистов и экспериментаторов привлекает полусинтетическое производное линкомицина 7-хлор-7-дезоксилнкомицин (клиндамицин, собелин), в молекуле которого в 7-м положении ОН-группа заменена на атом хлора. По данным зарубежных исследователей, он в 4—8 раз активнее исходного антибиотика, хотя их спектр противобактериального действия сходен. Накоплен достаточно большой опыт применения клиндамицина в условиях клиники, показавший его высокую эффективность при ряде процессов, вызванных чувствительной к нему флорой и в первую очередь стафилококками. Он с успехом использован при остеомиелите, сепсисе, пневмонии, раневой инфекции и других заболеваниях стафилококковой природы. Препарат был экспериментально изучен в Советском Союзе. Было показано, что подавляющие и бактерицидные его концентрации в 4—16 раз меньше, чем концентрации линкомицина гидрохлорида (М. С. Поляк и др., 1972; М. С. Поляк, 1973). Преимущественная активность 7-хлор-7-дезоксилнкомицина была отмечена и в опытах на животных. В частности, была показана его эффективность при экспериментальной стафилококковой инфекции: дозы хлолинкоцина при этом были в 2—4 раза меньше лечебных доз линкомицина независимо от путей введения препаратов в организм. Интересными оказались результаты сравнительного изучения действия обоих препаратов на клостридии: при экспериментальной анаэробной газовой инфекции хлолинкоцин оказался в 2—8 раз активнее (табл. 29).

Токсичность 7-хлор-7-дезоксилнкомицина в эксперименте признана небольшой, переносимость препарата — хорошей (А. М. Думова и др., 1975), хотя в настоящее время вызывают большую настороженность сообщения о тяжелых колитах, возникающих при лечении клиндамицином.

Сочетанная антибиотикотерапия может быть отнесена к наиболее давнему приему, используемому для борьбы с резистентной микробной флорой; комбинацию пенициллина со стрептомицином стали использовать вскоре после появления стрептомицина в клинической практике (Robbins, Tompsett, 1951). Вместе с тем до сегодняшнего дня механизмы совместного действия двух антибиотических препаратов на микробную клетку изучены чрезвычайно мало, а о молекулярных механизмах этого процесса практически ничего не известно. Широкое распространение во многих странах фиксированных антибиотических препаратов комплексного действия и лекарственных форм, соче-

тающих антибиотиков с другими химиотерапевтическими агентами, вызывало закономерную критику со стороны многих специалистов, которая, однако, в ряде случаев неправомерно распространилась и на всю проблему сочетанной терапии в целом. Тем не менее комплексная антибиотикотерапия остается весьма распространенным методом в клинической практике, ее полезность в ряде случаев несомненно доказана, а некоторые препараты комплексного действия пользуются большой популярностью у врачей.

ТАБЛИЦА 29

Заражающий агент	Препарат	Путь введения	Минимальная защитная доза, мкг/мышь	ЭД ₅₀ , мкг/мышь
Cl. perfringens шт. 28	7-хлор-7-дезоксилин-комицин	в/в	28	60±15,8
	Линкомицин	в/в	120	170±11,7
	7-хлор-7-дезоксилин-комицин	в/м	180	240±22,2
	Линкомицин	в/м	200	260±29,5
	7-хлор-7-дезоксилин-комицин	Внутрь	410	650±94,6
	Линкомицин	Внутрь	1300	2300±409,1
Cl. perfringens шт. 48	7-хлор-7-дезоксилин-комицин	в/в	34	68±15,8
	Линкомицин	в/в	130	220±34,7
Cl. septicum шт. 5	7-хлор-7-дезоксилин-комицин	в/в	79	120±31,2
	Линкомицин	в/в	880	1500±114,8

С. М. Навашин и И. П. Фомина (1974) так определяют показания для комбинированной антибиотикотерапии:

«1) тяжелое течение инфекций, требующее немедленного начала лечения до установления бактериологического диагноза (в большинстве таких случаев эффект может быть достигнут и при монотерапии, однако возможность смешанной инфекции оправдывает применение комбинации антибиотиков);

2) смешанная инфекция с выделением различных микробных ассоциаций, как это имеет место при перфоративных процессах в брюшной полости или заболеваниях дыхательного тракта, мочевыводящих путей, особенно после инструментального обследования;

3) предупреждение развития токсического действия за счет достижения быстрого и более полного эффекта при одновременном воздействии двух (или нескольких) препаратов в меньших, чем обычные терапевтические, дозах;

4) предупреждение или замедление развития устойчивости;

5) возможность усиления антибактериального эффекта в расчете на синергидное действие антибиотиков;

6) воздействие на малочувствительные возбудители.

Комбинированная антибиотикотерапия особенно показана при смешанных инфекциях, подтвержденных бактериологически. Она проводится также при тяжелых состояниях сразу после взятия материала для бактериологического исследования вплоть до установления точного диагноза заболевания и, наконец, в профилактических целях».

Значимость каждого из приведенных показаний очевидна, однако не каждое из них в полной мере убедительно подтверждено существующей практикой. Не вызывает сомнений польза от сочетаний антибиотиков при процессах, вызванных смешанной флорой, если каждый из микроорганизмов отличен по чувствительности к взятым препаратам. Естественно, что даже возможность подобной ситуации оправдывает комбинированное лечение. Весьма заманчивой представляется попытка повысить эффективность антибиотикотерапии, основанная на возможности потенцированного действия препаратов на микробную клетку. Однако этот вопрос представляется достаточно сложным. Микробная популяция в тканях является динамичной системой, включающей клетки разной степени чувствительности к препаратам и метаболической активности, концентрация антибиотиков в макроорганизме постоянно меняется. Все это резко отличается от тех условий, которые существуют *in vitro* при изучении сочетанного действия антибиотиков, да и существующие методы оценки сочетанного действия антибиотиков на бактерии не совершенны. Вместе с тем установление характера такого действия представляется абсолютно необходимым независимо от того, что служит основанием для назначения двух антибиотиков одновременно.

Сочетанное действие антибиотиков на микроорганизмы может быть синергидным, суммарным, индифферентным и антагонистическим. Первое представляется тем наилучшим вариантом, к которому стремится любой врач, второе допустимо и может быть при определенных условиях желательным. Третий тип действия исключает необходимость в комплексном применении препаратов; последний крайне нежелателен. Каковы же те закономерности, которые определяют возможное проявление того или иного типа действия? Впервые принцип рационального отбора антибиотических пар был сформулирован Jawetz с соавт. (1950, 1958), которые разделили все антибиотики на бактериостатические и бактерицидные, утверждая, что при сочетании первых (группа Б) обычно наблюдают индифферентное действие, при сочетании вторых (группа А) возможен синергизм, а при сочетании представителей разных групп — антагонизм. В дальнейшем это положение неоднократно было предметом развития и расширения за счет новых антибиотиков. В настоя-

щее время оно остается неизменным, но в несколько иной формулировке (С. М. Навашин, И. П. Фомина, 1974а). Как известно, бактерицидный тип действия (антибиотики группы А) характерен для бензилпенициллина и полусинтетических пенициллинов, стрептомицина, неомicina, канамицина, полимиксинов, ванкомицина, цефалоспоринов, бацитрацина. Пенициллины, стрептомицины, ванкомицины, цефалоспорины действуют на микроорганизмы лишь в стадии размножения; полимиксин, неомиксин, канамицин — как в стадии размножения, так и покоя.

Бактериостатический тип действия (антибиотики группы Б) свойствен тетрациклинам, левомицетину, эритромицину, олеандомицину, циклосерину и виомицину.

С учетом спектра антибактериального действия антибиотики разделены на следующие основные группы:

Группа 1. Препараты, активные в отношении грамположительных микроорганизмов и грамотрицательных кокков:

а) с выраженным бактерицидным действием: пенициллин, ванкомицин, цефалоспорины, бацитрацин;

б) иногда в высоких концентрациях с бактерицидным действием: макролиды, новобиоцин, линкомицин;

в) действующие только бактериостатически (фузидин).

Группа 2. Препараты широкого спектра действия (с бактериостатическим типом действия): тетрациклины, хлорамфеникол (левомицетин).

Группа 3. Препараты широкого спектра действия, высокоактивные в отношении грамотрицательных возбудителей (с выраженным бактерицидным действием): канамицин, неомиксин, полимиксин.

При сочетании антибиотиков группы А возможно синергидное, аддитивное и индифферентное действие. Сочетание антибиотиков группы Б приводит к аддитивному или индифферентному действию. При сочетании антибиотиков групп А и Б возможно индифферентное, антагонистическое или синергидное действие. Как будет показано далее, эффект обусловлен степенью чувствительности данного возбудителя к взятым в пару антибиотикам.

Определенное признание нашла схема Manten (1954), согласно которой антагонизм наиболее вероятен при сочетании пенициллинов с антибиотиками, обладающими бактериостатическим действием (левомицетином, тетрациклином, эритромицином и олеандомицином). При остальных вариантах сочетаний антагонизм, с точки зрения автора, маловероятен. Число схем подобного рода достаточно велико, однако все они во многом повторяют схему, предложенную Jawetz.

Имеются многочисленные исследования, авторы которых пытались установить, насколько то или иное сочетание способно продемонстрировать тот или иной эффект. Общим их недостатком является то, что в подавляющем большинстве случаев экс-

перименты были выполнены *in vitro*. Однако определенную полезную информацию эти материалы дают.

Большое количество авторов считают, что сочетания пенициллина и стрептомицина являются активными, особенно по действию на стрептококки. А. И. Семич (1952) наблюдала синергизм пенициллина и стрептомицина при воздействии на брюшно-тифозные бактерии.

Glezel et al. (1973), используя метод диффузии через целлофан, изучали бактерицидное действие цефалоридина в сочетании с различными антибиотиками (всего 189 комбинаций). Авторы обнаружили наличие синергизма при сочетании антибиотика с аминогликозидами, рифампицином и β -лактамами антибиотиками и подтвердили его антагонизм с хлорамфениколом и тетрациклином. В опытах *in vitro* весьма эффективным против резистентных стафилококков оказалось сочетание канамицина и цефалотина.

По данным Klastersky et al. (1972) и многих других авторов, комбинация карбенициллина с гентамицином обладала выраженным синергидным действием в отношении испытанных штаммов *P. aeruginosa*.

Максимальное синергидное действие достигается, по данным В. А. Цыганова (1964), при соотношении разных весовых концентраций препаратов применительно к каждому штамму отдельно. Если синергизм обнаруживался у данной пары антибиотиков, действующих на определенный микроорганизм, то он обычно распространялся на широкий ряд концентраций каждого из препаратов, как это наблюдалось автором при исследовании соотношений различных концентраций сочетания левомецетина с хлортетрациклином. Следует согласиться с автором, что это свойство некоторых сочетаний особенно важно в смысле практического их использования, так как поддержание концентраций антибиотиков на определенном уровне в организме, а особенно в отдельных его тканях, представляет значительные трудности. На основании проведенных исследований автор допускает, что действие одного и того же сочетания может быть синергидным, индифферентным или антагонистическим даже в том случае, когда оно испытывается против микроорганизмов одного вида. Так, например, по его данным, хотя сочетание стрептомицина с пенициллином в отношении кишечной палочки бывает чаще всего синергидным, если культуры высокорезистентны к пенициллину, то может наблюдаться и антагонизм.

В. В. Квирикадзе (1955) приводит данные, показывающие, что при применении пенициллина с хлортетрациклином в терапевтических целях, а также в опытах в пробирке наблюдается различное действие смеси этих антибиотиков в зависимости от возбудителя инфекции. Ярko выраженный антагонизм отмечен при стафилококковой инфекции, в то время как при лечении пневмококков отмечалось индифферентное действие.

Аналогичные результаты приводят Bliss, Warth, Long (1952), из которых следует, что хлортетрациклин является антагонистом по отношению к пенициллину при применении их в сочетании при экспериментальной стрептококковой инфекции у белых мышей, но при пневмококковой инфекции оба агента были синергистами.

О зависимости результатов применения различных комбинаций антибиотиков от свойств тест-микроорганизма сообщают также Jawetz, Gunnison (1950) и др.

Barr, Carman (1954) указывают на наблюдавшиеся ими явления антагонизма между неомицином и эритромицином в отношении грамположительных микробов и синергизма в отношении грамотрицательных. Информацию подобного рода можно было бы существенно расширить, однако принципиально все авторы сходятся на той точке зрения, что проявление того или иного типа действия индивидуально для каждого штамма. Вместе с тем есть сочетания, которые с большей вероятностью способны обеспечить потенцированное действие или, наоборот, привести к уменьшению эффективности терапии.

Среди утвердившихся в клинической практике сочетаний могут быть упомянуты пенициллины с аминогликозидами, бензилпенициллин или ампициллин с пенициллиназоустойчивыми пенициллинами, тетрациклины с макролидами или левомецетином. Среди перечисленных антибиотических пар в наибольшей степени установлен механизм сочетанного действия пенициллиназо-чувствительных и пенициллиназоустойчивых β -лактамных антибиотиков.

В 1956 году Abraham и Newton установили, что цефалоспорины С, который был устойчив к гидролизу β -лактамазой 1 из *Bac. cereus*, оказался конкурирующим ингибитором гидролиза бензилпенициллина этим ферментом.

Впоследствии были предприняты попытки обнаружить синергизм между пенициллином и цефалоспорином против образующих пенициллиназу стафилококков. Эти попытки были малоуспешными, так как цефалоспорин, хотя он и является мощным конкурентным ингибитором фермента, сам показал высокую антистафилококковую активность. Но в 1965 году Sabath et al. нашли, что индуцируемый фермент из штамма *P. aeruginosa* сильно ингибировался метициллином и клоксациллином. Сходные наблюдения были сделаны с β -лактамазой из *Klebsiella* sp. После этого четкий синергизм был обнаружен при совместном испытании *in vitro* клоксациллина или метициллина и легко гидролизуемого представителя семейства пенициллинов или цефалоспоринов.

Количество конкурентных ингибиторов некоторых β -лактамаз из грамотрицательных бактерий было увеличено. Cole, Elson и Foolbrook (1972), показавшим, что 2-изопропоксн-1-нафтилпенициллин является особенно сильным конкурентным инги-

битором как β -лактамазы из штамма *E. aerogenes*, так и β -лактамазы из штамма *E. coli*, рост которых не подавляется эффективно клоксациллином и слабо ингибируется метициллином.

Синергидные смеси пенициллинов или цефалоспоринов, либо тех и других, если один из компонентов смеси является сильным и конкурентным ингибитором β -лактамазы, а другой обладает значительной антибактериальной активностью, оказывали благоприятное действие при некоторых заболеваниях мочевого тракта (Sabath et al., 1966).

С открытием новых конкурентных ингибиторов представляется реальным, что такой подход может иметь клиническое применение. Однако структурные особенности необходимых препаратов пока определить трудно. Соединения, имеющие высокое сродство в отношении β -лактамаз, образуемых *P. aeruginosa*, могут иметь меньшее сродство в отношении других β -лактамаз из грамотрицательных бактерий и быть неспособными конкурировать за активные «сайты» с субстратами, обладающими выраженной антибактериальной активностью. Например, сродство в отношении метициллина у β -лактамазы из устойчивого к карбенициллину штамма *P. aeruginosa* ниже такового, чем к самому карбенициллину (McPhail et al., 1973). Кроме того, все еще неясно, может ли высокое сродство в отношении активного «сайта» β -лактамазы быть свойством любого соединения, которое не содержит кольцевой системы 6-АПК, 7-АЦК в конфигурации естественного стереоизомера. 6-Эпибензилпенициллин, который отличается от бензилпенициллина своей стереохимией при С-6 β -лактамного кольца, не показал значительного сродства в отношении β -лактамаз из 2 штаммов *P. aeruginosa* (McPhail et al., 1973). Феноксиметил-6-метилпенициллин, у которого метильная группа заменяет водород при С-6 в кольцевой системе пенициллина, не обнаруживает способности конкурировать с субстратами за β -лактамазу из *Bac. cereus* (Abraham, 1972). С другой стороны, 7-метоксицефалоспорины обладают определенной активностью как конкурентные ингибиторы некоторых β -лактамаз.

Таким образом, каковы бы ни были успехи, достигнутые в обнаружении новых пенициллинов или цефалоспоринов, обладающих антибактериальной активностью, но не чувствительных к различным типам β -лактамаз, или соединений, которые являются конкурирующими ингибиторами или необратимо инактивируют эти ферменты, проблемы, связанные с резистентностью к β -лактамам антибиотикам, остаются по-прежнему серьезными.

Тем не менее накопленные материалы позволили обосновать целесообразность создания фиксированного антибиотического препарата комплексного действия, сочетающего ампициллин с оксациллином или клоксациллинами. В нашей стране нашел применение ампиокс (ампициллин с оксациллином), применяе-

мый как внутрь, так и парентерально. Сравнительно большой клинический опыт применения ампинокса или его зарубежного аналога позволяет положительно оценить эффективность препаратов при инфекционных процессах, вызванных преимущественно грамотрицательной или смешанной флорой. Показана их терапевтическая ценность при тяжелых заболеваниях легких, желче- и мочевыводящих путей, раневой инфекции и многих других. Несомненно важным и ценным свойством этих препаратов является низкая токсичность, позволяющая варьировать дозы в широких пределах в зависимости от патологии и состояния больного.

Среди новых препаратов комплексного действия, которые используются для терапии инфекций, вызванных различными видами микроорганизмов, могут быть названы олеморфоциклин и морфолевоциклин, созданные на основе морфолниметилтетрациклина (морфоциклина), левомицетина сукцината и олеандомицина. Они предназначены для внутривенного введения, что позволяет достичь больших концентраций антибиотиков в организме, чем при иных путях введения.

Значительный интерес клиницистов к сочетанному применению тетрациклинов с другими антибиотиками явился основанием для всестороннего изучения комплексного действия тетрациклинов и левомицетина (хлорамфеникола), которые относятся к числу широко используемых в медицинской практике.

Морфолевоциклин при фармакологическом изучении оказался сравнительно малотоксичным антибиотиком. Его повреждающее действие меньше суммарной токсичности обоих исходных антибиотиков. Максимально переносимая доза морфолевоциклина для белых мышей при внутривенном введении составляет в пересчете на морфоциклин 72 000—140 000 ЕД/кг, LD₅₀ при этом же пути введения — 84 500—168 000 ЕД/кг. Спектр противобактериального действия морфолевоциклина соответствует спектрам левомицетина и тетрациклина. Он активен в отношении чувствительных к тетрациклину или левомицетину стафилококков, клостридий, кишечных палочек, сальмонелл, шигелл, протеев, вибрионов холеры и других бактерий, риккетсий и крупных вирусов.

Основой для создания морфолевоциклина явилась серия экспериментов, направленных на изучение сочетанного действия морфоциклина (N-морфолниметилтетрациклина) с левомицетином на ряд тест-объектов. Было показано, что это сочетание обладает выраженными потенцирующими свойствами в отношении многих грамотрицательных и грамположительных бактерий как в пробирочных опытах, так и в опытах на животных: сюда относятся эшерихии, протей, палочка синезеленого гноя, капсульные бактерии (М. С. Поляк, 1969). В частности, *in vitro* это выражалось в уменьшении минимальной бактериостатической и бактерицидной концентраций в 2—8 раз для наиболее

активного антибиотика при условии, что второй препарат брали в дозе, которая была в 2—20 раз меньше минимальной бактериостатической или минимальной бактерицидной. Характерны те соотношения активностей, при которых потенцирование проявлялось наиболее часто. Это прежде всего такой вариант, когда оба антибиотика брались в дозе, приближающейся к МПК (1:1). В этом варианте потенцирование отмечалось чаще и в наибольшей степени. Убывание дозы одного из антибиотиков обычно уменьшало степень потенцирования или оно исчезало вовсе. Однако в отношении псевдомонад, эшерихий, капсульных бактерий использование меньших доз тетрациклин нового антибиотика при стабильной концентрации левомицетина позволяло выявить синергидное действие даже при соотношениях по активности 1:20. В целом та или иная степень потенцирующего действия была отмечена в отношении 70% взятых культур различных грамотрицательных бактерий.

Данные, полученные *in vitro*, нашли подтверждение в опытах на животных. Было найдено, что совместное использование морфоциклина и левомицетина позволяет достичь большего химиотерапевтического эффекта, чем от применения каждого из них, при условии, что один из антибиотиков был взят в неактивной дозе. Это было продемонстрировано, в частности, при экспериментальном сепсисе, вызванном палочкой синезеленого гноя. Антибиотики тетрациклиновой группы при этой инфекции практически не активны. Левомицетин был активен, но только в большой дозе (более 300 мг/кг). Сочетанное использование двух антибиотиков позволило уменьшить ЭД₅₀ в разных опытах от 2 до 4 раз. Такие показатели, как продолжительность жизни животных, обсемененность органов, отражали те же закономерности.

Морфолевоциклин широко изучен в клинической практике; накоплен значительный опыт его применения при тяжелых заболеваниях бактериальной природы (Е. К. Селезнев и др., 1972; С. С. Ткаченко и др., 1973). Внутривенное введение препарата позволяет быстро достичь высоких концентраций его в организме. Показаниями для применения морфолевоциклина служат перитонит, пневмония, абсцессы легкого, гнойный плеврит, воспалительные заболевания желчных и мочевыводящих путей, а также женской половой сферы. Высокая эффективность препарата при экспериментальных клостридиозах послужила основанием для его всестороннего изучения при раневых инфекциях, причем результаты были расценены как весьма положительные. Особо следует выделить эффективность препарата при перитоните, осложнившем острые хирургические заболевания живота, что закономерно вытекает из особенностей этиологического фактора.

Полученные данные о совместимости и синергидном характере действия левомицетина и тетрациклина, а также этих двух

антибиотиков с грамицидином послужили основанием для создания ряда препаратов комплексного действия для местного применения. Среди них следует отметить лекарственные формы в аэрозольной упаковке легразоль и тегралезоль. В композицию первой входят левомицетин и грамицидин, второй — левомицетин, грамицидин и тетрациклин. Ограниченное использование грамицидина в клинической практике, связанное во многом с отсутствием удобной лекарственной формы, определило в значительной степени отсутствие резистентных к нему штаммов стафилококков. Концентрации других антибиотиков подобраны таким образом, чтобы обеспечить их подавляющее действие на грамотрицательные микроорганизмы. Экспериментальное и широкое клиническое изучение препаратов подтвердило их эффективность как противомикробных средств при ожогах, ранах и гнойных заболеваниях кожи. Показано их подавляющее действие в отношении большинства возбудителей гнойных инфекций. Легразоль и тегралезоль рекомендованы к клиническому применению.

Сочетанное использование антибиотиков макролидной группы и тетрациклинов является распространенным приемом клинической практики. Как показано в ряде исследований, это позволяет получить синергидное действие в отношении некоторых микроорганизмов, прежде всего стафилококков, расширяет противомикробный спектр препаратов, что особенно необходимо при смешанном характере флоры, препятствует селекции резистентных штаммов.

Хорошо известны такие препараты, как сигмамицин (США), тетраолеан (Болгария), олететрин (СССР), в которых, однако, доза олеандомицина меньше, чем в олеморфоциклине. Кроме того, в них использован тетрациклин. Вместе с тем внедренный в Советском Союзе препарат тетрациклиновой группы морфоциклин (N-морфолинметилтетрациклин) обладает в сравнении с гидрохлоридом тетрациклина рядом существенных для клиники преимуществ. Нейтральный pH его растворов позволяет вводить морфоциклин одномоментно струйно, в то время как гидрохлорид тетрациклина и его сочетанные лекарственные формы с олеандомицином вводят только капельно. Было показано, что морфоциклин обладает рядом других преимуществ, которые будут названы далее.

Изучение основных фармакологических свойств олеморфоциклина в острых и хронических опытах показало его сравнительно низкую токсичность (Г. А. Михайлец и др., 1968). Максимально переносимая доза препарата для белых мышей при внутривенном введении составляет 120—180 мг/кг, LD_{50} — 160—230 мг/кг.

Химioterапeвтичeская активностъ олеморфоциклина в сравнении с действием морфоциклина и олеандомицина оказалась преимущественной при ряде экспериментальных инфекций, в том

числе вызванных кишечной палочкой, различными видами патогенных клостридий и стафилококком.

Олеморфоциклин широко применяют в клинической практике для лечения тяжелых заболеваний бактериальной природы. Показана его эффективность при поражении органов дыхания, мочевыводящих и желчевыводящих путей, раневой инфекции и ряде других страданий, вызванных стафилококками, стрептококками, эшерихиями, клебсиеллами, в том числе устойчивыми к другим антибиотикам.

В клинической практике неоднократно делались попытки для преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам или для увеличения возможности контакта антибиотиков с бактериальной клеткой использовать сочетанную терапию противомикробными и иными биологически активными веществами. В качестве последних использовали гормоны, пиримидиновые производные, различные детоксикаторы, ферменты. С точки зрения обсуждаемой проблемы преодоления резистентности бактерий к антибиотикам, определенный интерес представляют ферменты, поскольку, как это будет показано далее, существуют материалы, свидетельствующие о том, что некоторые протеазы повышают чувствительность микроорганизмов к химиотерапевтическим веществам.

Сочетанная терапия антибиотиками и ферментами в последние годы находит все большее распространение в клинической практике. Отмечено, что при этом сокращаются сроки течения некоторых заболеваний инфекционной природы, наблюдается быстрое очищение ран и ускоряются процессы их заживления (К. Н. Веремеенко, 1967; В. И. Стручков и др., 1970; В. И. Стручков и др., 1973). В этом плане наибольший интерес привлекают протеолитические ферменты; среди них ферменты бактериальной природы стрептокиназа и стрептодорназа, ферменты животного происхождения химопсин, трипсин, химотрипсин, рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза.

В 1951 году Preiser, Roetting, Curtis (цит. по В. И. Стручкову и др., 1970) установили, что сочетанная терапия антибиотиками и ферментами создает благоприятные условия для скорейшего заживления ран различного происхождения. В частности, отмечено увеличение противомикробной активности. Авторы предположили, что высокая эффективность лечения в данном случае была обусловлена некролитическим действием ферментов на нежизнеспособные ткани, что способствовало прямому контакту антибиотика и возбудителя заболевания. Известно, что некротические ткани являются своеобразным барьером для антибиотиков и могут быть в ряде случаев причиной неэффективной антибиотикотерапии.

Изучение сочетанного действия антибиотиков и ферментов позволило прийти к выводу, что энзиматический протеолиз способствует лучшему контакту противобактериального вещества

с микробной клеткой и что именно это обстоятельство повышает эффективность противомикробной терапии.

Эти результаты нашли дальнейшее подтверждение в работах Beltrami, Princiotta (1961), которые показали преимущественную активность комбинаций трипсина с антибиотиками. Помимо указанного объяснения синергидного действия антибиотиков и протеолитических ферментов, были высказаны и другие. Так, в 1958 году Abderhalden показал, что трипсин разрушает бактериальный фермент пенициллиназу.

Некоторые авторы связали большую активность сочетаний антибиотиков и ферментов с фармакокинетикой их в макроорганизме. Так, исследования Moss (1957) были посвящены особенностям распределения в организме экспериментальных собак пенициллина при совместной терапии с трипсином. Отмечено, что количество определяемого пенициллина в спинномозговой жидкости опытных животных было втрое большим, чем у контрольных собак, которые получали пенициллин без фермента. Ряд подобных исследований выполнен в СССР Г. Я. Кивманом с сотр. (1973).

Большой интерес представляют данные о непосредственном действии фермента на микробную клетку, что также могло потенцировать действие антибиотиков.

В этом направлении работал Endler (1956), который установил факт инаktivирования протеазами микробных токсинов. Некоторые авторы продемонстрировали способность ферментов, в частности пепсина, бактерицидно действовать на микроорганизмы (И. Д. Корабельников, 1927).

Другие исследователи полагают, что ферменты (гидролазы) изменяют чувствительность бактерий к антибиотикам. В. И. Стручков с соавторами (1970) изучали действие ферментов животного происхождения (трипсина, химотрипсина, рибонуклеазы и бактериального препарата диккиназы) на чувствительность к антибиотикам стафилококков и кишечных палочек. Методически эти опыты проводились следующим образом: в пробирки с раствором фермента и антибиотика добавляли микробную взвесь, смесь инкубировали в течение 18 ч. Затем определяли чувствительность культур к антибиотикам. Параллельно определяли антибактериальное действие ферментов. В результате проведенных исследований авторы сделали вывод, что совместное применение антибиотиков и ферментов в опытах *in vitro* приводит к снижению антибиотикорезистентности некоторых микроорганизмов. При изучении непосредственного действия химопсина и диккиназы на бактериальные клетки палочки синезеленого гноя, кишечной палочки, стафилококка не было установлено ингибирующего действия на их рост и размножение. По мнению авторов, сочетанное действие ферментов и антибиотиков является потенцирующим, но в этом случае не имеет места бактериостатическое или бактерицидное

действие самого фермента на микробную клетку. Показано также, что резистентность микроорганизмов к антибиотикам возникает значительно медленнее, если последние используют для лечения вместе с ферментами.

П. Н. Стеблюком (1973) было установлено, что комбинированное действие стрептомицина и рибонуклеазы на резистентные штаммы патогенного стафилококка, кишечной, синегнойной палочек и протей повышает чувствительность микробов к стрептомицину в 4—8 раз. Считают (В. И. Стручков и др., 1970), что механизм ингибирующего действия на патогенную микрофлору обоих веществ не связан только с улучшением контакта антибиотика и клетки, так как в отсутствие некротических тканей ферменты так же потенцируют действие антибиотиков.

Наиболее перспективными в этом плане явились комбинации ферментов химопсина, дикиназы с неомицином, стрептомицином и гликоциклином. Сочетания гликоциклина и дикиназы значительно подавляли устойчивость псевдомонад к гликоциклину. Палочки синезеленого гноя, которые проявляли выраженную резистентность к бензилпенициллину, после воздействия дикиназы и пенициллина заметно снижали устойчивость к антибиотику. Исследователями было показано, что ферменты бактериальной природы оказывают больший эффект, чем ферменты животного происхождения.

Проведенное этими же авторами изучение влияния антибиотиков и ферментов на микробные ассоциации показало перспективность использования комбинаций пенициллина и химопсина, пенициллина и дикиназы, неомицина и дикиназы. Интересен тот факт, что под влиянием дикиназы или химотрипсина отмечалось снижение устойчивости микробных ассоциаций к гликоциклину, причем непосредственного действия фермента на рост культур не наблюдали.

Представляют интерес результаты исследований, выполненные со стафилококками, устойчивыми к ряду антибиотиков, которые подвергались действию ферментов в количествах, соответствующих разовым лечебным дозам при местном их применении (В. И. Стручков и др., 1973). Так, после воздействия ферментов 60% исследуемых устойчивых к пенициллину стафилококков стали более чувствительными к пенициллину; последующее воздействие химопсина или дикиназы привело к дальнейшему увеличению чувствительности к антибиотику у половины штаммов.

Сходные тенденции наблюдали при изучении чувствительности кишечных палочек после воздействия на них антибиотиков и ферментов. Определение чувствительности к антибиотикам проводили, используя метод диффузии в агар с помощью стандартных дисков. Исследуемые варианты эшерихий обладали выраженной устойчивостью к стрептомицину и пенициллину. После воздействия протеолитических ферментов совместно

с пенициллином чувствительность культур заметно увеличивалась.

Однако в опытах по влиянию стрептомицина и ферментов на чувствительность эшерихий было отмечено значительно меньшее снижение антибиотикоустойчивости, чем в опытах с пенициллином. Сочетанное использование гликоциклина и протеаз не дало такого же эффекта, в то же время в ряде случаев под воздействием рибонуклеазы имело место снижение чувствительности исследуемых штаммов к антибиотику.

О целесообразности комплексного применения антибиотиков и ферментов говорят данные, полученные авторами (В. И. Стручков и др., 1975) в клинике: в процессе энзимотерапии происходит уменьшение числа патогенных штаммов, число плазмокоагулирующих штаммов стафилококков уменьшалось к концу лечения с 90% до 22% у больных с трофическими язвами и до 14% у больных с гнойными ранами.

Было отмечено, что ферментная терапия больных с острыми абсцессами легких приводила к снижению устойчивости микрофлоры к антибиотикам; к пенициллину — на 24,1%, к оксациллину — на 34,1%, к метициллину — на 38,0%, к фурагину К — на 28,3%.

При хронических гнойных заболеваниях легких выраженное снижение антибиотикорезистентности микроорганизмов имело место при совместной терапии протеолитическими ферментами и препаратами нитрофуранового ряда.

Изучение изменения чувствительности микрофлоры к антибиотикам по годам у больных, лечившихся антибиотиками, показало, что через 3 года от начала широкого применения ферментов на 18—23% уменьшилось число штаммов, устойчивых к левомецетину и эритромицину, на 7—11% — устойчивых к мономицину.

Было изучено действие *in vitro* и *in vivo* левомецетина, неомицина и грамицидина в сочетании с ферментами микробного происхождения террилитном и гигролитном (И. К. Лагерт и др., 1975).

Для изучения подавляющего и бактерицидного действия были использованы следующие методические приемы:

а) определяли число жизнеспособных клеток в среде, содержащей различные концентрации фермента, антибиотиков и их сочетаний;

б) изучали чувствительность к антибиотикам бактериальных клеток, подвергшихся действию различных концентраций фермента.

Изучение действия террилитина на различные штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий выявило возможность подавления размножения и жизнеспособности клеток. Однако оно было индивидуальным для каждого штамма и зависело от продолжительности и условий вегетации. Было от-

мечено, что террилитин подавляюще действует на ряд штаммов золотистого стафилококка. Ингибирующее действие выражалось в течение первых часов инкубации в задержке процесса размножения или частичной гибели инокулята. В дальнейшем процесс размножения хотя и продолжался, но носил частичный характер — конечная плотность биомассы значительно уступала плотности биомассы в контроле.

Несколько иные закономерности были отмечены при изучении действия террилитина на грамотрицательные бактерии. Возможность подавления была отмечена в отношении кишечных палочек. Однако это действие было значительно менее выраженным, чем в отношении стафилококков. При изучении действия террилитина на штаммы синегнойной палочки и протей подавляющего действия фермента отмечено не было.

Изучение сочетанного действия террилитина с антибиотиками (левомецетином, грамицидином, эритромицином) на микроорганизмы выявило возможность увеличения активности последних, особенно в отношении стафилококков. В опыте на кровяном сгустке отмечали потенцирование действия антибиотика в 2—5 раз, возможно связанное с разжижением сгустка, что способствовало лучшему контакту бактериальных клеток с ферментом. С другой стороны было показано, что 3-часовая инкубация взвеси бактериальных клеток в водно-солевом растворе гигролитина, концентрации которого не обладали литическим действием в отношении микроорганизмов, повышали их чувствительность к неомицину. Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотика для стафилококков и эшерихий, подвергшихся действию фермента, показало, что они были в 2—8 раз меньше МПК для исходных штаммов. Однако подобное действие не проявилось в отношении псевдомонад и протеев.

Изучение действия террилитина и гигролитина и их сочетаний с антибиотиками на ожоги — II—III степени экспериментальных животных выявило преимущественную активность сочетаний по сравнению с действием каждого из препаратов в отдельности. В этих экспериментах ожоговую рану обсеменяли ассоциацией бактерий (стафилококк, кишечная палочка и палочка синезеленого гноя). Подавление жизнеспособности стафилококков отмечали уже через 2—3 дня от начала лечения (террилитин + неомицин), на 3—4-е сутки исчезала культура кишечной палочки. В контрольных опытах сроки исчезновения микроорганизмов были в 2—4 раза большими. В зависимости от дозы фермента, антибиотика и выбранных сочетаний абсолютные показатели подавления роста культур колебались в широких пределах, однако тенденции были сходны: сочетанный препарат был эффективнее.

Экспериментальные данные послужили основанием для создания лекарственных форм комплексного действия легграферм

и неотерриксиновая мазь, которые проходят клиническое изучение.

В целом следует отметить, что наши знания о сочетанном действии гидролаз и антибиотиков на микробную клетку носят весьма ограниченный характер. Механизмы этого явления не изучались. Совершенно очевидно, что для каждого фермента и антибиотика или их групп они будут индивидуальны. Расшифровка механизмов сочетанного действия антибиотиков и ферментов на микроорганизмы будет иметь большое значение для практической медицины, это — насущная задача сегодняшнего дня.

Приведенные материалы характеризуют ряд методов, используемых для борьбы с устойчивой флорой в клинике. Целесообразность некоторых не вызывает сомнения, другие представляются спорными. Очевидно, что применение новых эффективных препаратов, к которым чувствительны микроорганизмы, было и остается ведущим приемом, возражение против которого может быть выдвинуто только в том случае, если арсенал новых веществ окажется исчерпанным. Вместе с тем представленный в данной главе обзор отчетливо свидетельствует об отсутствии какой-либо схемы лечения инфекционного больного или какого-либо препарата, которые были бы разработаны на основе нашего знания механизмов резистентности, путей распространения этого феномена среди бактерий в окружающей среде или в организме больного. Тем более важным представляются развитие и практическая реализация тех путей подавления устойчивости, которые намечены пока в эксперименте и приведены выше. Решение подобной задачи отвечает потребностям современного здравоохранения и может открыть принципиально новые пути в борьбе с заболеваниями человека микробной природы.

Алек
ние
вли
с. 7
Али х
тер
Анци
мис
Хиз
орп
Аш м а
мес
бак
ни
269
Бело
сти
ри
ан
ти
Бело
эр
С
с.
Бело
ст
«А
Бел
о
В
м
М
Бо А
п
М
Бон
Бра
Бре
Бро
с
т
Бул
и
Бул

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеевич Н. Т., Пилецька И. Е., Никонорова В. П. Повышение чувствительности микрофлоры патологических к стрептомицину под влиянием лимекаина и трипсина.— «Журн. микробиол.», 1973, № 6, с. 766—769.
- Алиханян С. И., Суходолец В. Б. Генетические рекомбинации у бактерий.— В кн.: Успехи микробиологии, в. 1. М., 1964, с. 101.
- Анциферова Н. Г., Броднинова Н. С., Мороз А. Ф. Влияние бромистого этидия на трансдукционную передачу R-фактора у *E. coli* — В кн.: Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов. М., 1973, с. 273—274.
- Ашмарин И. П., Ждан-Пушкина С. М., Вишневский Б. И. Совместное действие гистонов и антибиотиков *in vitro* и *in vivo*. Антибактериальное действие фракции гистонов тимуса теленка в сочетании со стрептомицином и тубазидом.— «Антибиотики», 1972, № 3, с. 266—269.
- Белоусова И. И., Лишневская Е. Б., Терешин И. М. Взаимодействие рибосом *E. coli* с хлорамфениколом. Влияние протамина гидрохлорида на связывание C^{14} -хлорамфеникола с рибосомами и на подавление антибиотиком синтеза полипептида в бесклеточной системе.— «Антибиотики», 1973а, № 5, с. 411—416.
- Белоусова И. И., Лишневская Е. Б., Терешин И. М. Влияние эритромицина и его сочетания с протамин-гидрохлоридом на связывание C^{14} -хлорамфеникола с рибосомами *E. coli* — «Антибиотики», 1973 б, № 2, с. 129—131.
- Белоусова И. И., Эльгарт Р. Е., Терешин И. М. Снижение резистентности к тетрациклину у *E. coli* под действием протамина *in vitro*.— «Антибиотики», 1973, в, № 1, с. 68—70.
- Белоусова И. И., Лишневская Е. Б., Терешин И. М. К вопросу о механизме действия протамина на резистентность к хлорамфениколу.— В кн.: Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов. Тезисы Всесоюз. конф., Москва 17—18 апреля 1973 г. М., 1973, с. 320—321.
- Бо А. (Bo A.), Катизоне Ф. (Catizone F.), Рензине Г. (Renzine G.). О распределении в человеческом организме доксициклина.— В сб.: Вибрамицин, М., 1974, с. 12—23.
- Боннер Дж. (Bonner J.). Молекулярная биология развития. М., 1967.
- Браун В. (Braun W.). Генетика бактерий. М., 1968.
- Бреслер С. Е. Введение в молекулярную биологию. М.— Л., 1963.
- Броднинова Н. С., Мороз А. Ф., Шатман Л. И. Устранение множественной лекарственной устойчивости у культур кишечной палочки аурантином и УФ-лучами.— «Антибиотики», 1970, № 3, с. 244.
- Булатов П. К. и др. Применение аэрозоля морфоциклина при воспалительных заболеваниях дыхательных путей.— «Клин. мед.», 1968, № 6, с. 122—126.
- Булгакова В. Г., Полин А. Н. Влияние грамицидина С на выход из клеток чувствительных и устойчивых к нему микроорганизмов нуклеотидов, неорганического фосфата и аминокислот.— «Антибиотики», 1966, № 6, с. 518.

- Веремеенко К. И. Протеолитические ферменты поджелудочной железы и их применение в клинике. Киев, 1967.
- Вильчок Т. Включение бактериальной ДНК в клетки млекопитающих.— Тезисы докладов IX Междунар. конгресса по микробиологии. М., 1965, с. 10.
- Вирина А. М., Фейгин А. М., Белоусова И. И., Терешин И. М. Изменение состава клеток *Candida albicans* при возникновении резистентности к полиенам и при выращивании в присутствии полиеновых антибиотиков.—Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Изучение механизма действия антибиотиков». Л., 1975, с. 34—36.
- Виттенау М. (Wittenu M.). Токсикиклин. Обсуждение некоторых особых качеств.— В сб.: Вибрамицин. М., 1974, 31—44.
- Воропаева С. Д., Вартанян А. М., Анкирская А. С. Изучение трансдукции лекарственной устойчивости у клинических штаммов стафилококков.— В кн.: Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов. М., 1973, с. 297.
- Галанова Р. Я. Некоторые особенности возникновения лекарственной устойчивости у золотистого стафилококка. Автореф. дисс. канд. М., 1968.
- Гаузе Г. Ф., Лайко А. В., Дудник Ю. В., Нетыкса Е. М., Кочеткова Г. В. О связи между чувствительностью к триафлавинолу и нуклеотидным составом ДНК у мутантов 5099.— «Докл. АН СССР», 1967, № 2, с. 470—472.
- Гейл Е. и др. (Gale E. F.). Молекулярные основы действия антибиотиков. М., 1975.
- Глатман Л. И. Ингибиторный анализ R-факторов у *E. coli* при конъюгации. Автореф. дисс. канд. М., 1972.
- Гольдфарб Д. Генетика бактерий.— В кн.: Общая генетика. М., 1965, с. 14—79.
- Гончарова Р. И. Антимутагенез. Минск, 1974.
- Губерниева Л. М., Силаев А. Б. К вопросу о комплексообразовании антибиотиков с нуклеиновыми кислотами.— «Антибиотики», 1964, № 8, с. 716—719.
- Дехтяренко Т. Н. Изучение состава ДНК у вариантов кишечной группы бактерий, полученных методом трансформации.— «Микробиология», 1964, в. 5, с. 807—811.
- Джилеспи Д. (Gillespie D.). Изучение и обнаружение гибридных комплексов ДНК-РНК.— В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М., 1970, с. 147—169.
- Дубинин Н. П., Черезанова Л. В. Антимутагенный и мутагенный эффекты стрептомицина.— «Докл. АН СССР», 1961, № 3, с. 703—704.
- Думова А. М. и др. Кинетика хлорлинкоцина у животных с нарушенным гормоидальным балансом.— «Антибиотики», 1975, № 7, с. 649—652.
- Ермольева З. В. Новые данные и основные задачи в изучении антибиотиков.— «Антибиотики», 1956, № 1, с. 5—10.
- Ермольева З. В. Антибиотики. Интерферон. Бактериальные полисахариды. М., 1965.
- Ермольева З. В. и др. Изучение химического состава и противоопухолевой активности протаминов, выделенных из молок осетровых рыб.— «Антибиотики», 1970, № 1, с. 25.
- Жакоб Ф. (Jacob F.), Вольман З. (Wollman E.). Пол и генетика бактерий. М., 1962.
- Закирова Т. Ф. Получение стрептомициноустойчивых и стрептомицинзависимых мутантов *Saccharomyces cerevisiae*.— В кн.: Селекция и генетика микробов. Новосибирск, 1971, с. 58—65.
- Захаров И. А., Квитко К. В. Генетика микроорганизмов. (Введение в генетический анализ). Л., 1967.
- Зуева В. С., Линевиц Ю. Г. Нарушение передачи внехромосомных факторов устойчивости в стафилококковых популяциях *in vitro* и *in vivo*.— В кн.: Лекарственная устойчивость микроорганизмов. (Всесоюзная конференция). Ереван, 1969, с. 56.

- Зуева В. С., Линевич Ю. Г. Интенсивность передачи плазмид в естественных условиях.— Собрание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 36—37.
- Зуева В. С., Шагимян М. А., Отман Л. С. Интенсивность появления в естественных условиях новых вариантов стафилококков в процессе генетического обмена.— Собрание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 35—36.
- Квирикадзе В. В. Действие антибиотиков (пенициллина, биомицина, эсмолина) и их комбинаций на микрофлору при острых катарах верхних дыхательных путей. Автореф. дисс. канд. М., 1955.
- Кивман Г. Я., Гейтман И. Я., Ермольева З. В., Калинин Н. А., Балынь И. Р. Некоторые особенности распределения полусинтетических пенициллинов у крыс под влиянием химотрипсина.— «Антибиотики», 1973, № 9, с. 830—832.
- Кинский С. (Kinsky S. C.). Полиеновые антибиотики.— В кн.: Механизм действия антибиотиков. М., 1969, с. 125—145.
- Климов А. Н. Пенициллины и цефалоспорины. Л., 1973.
- Климов А. Н., Малюга О. Н., Терешин И. М. Трансформация устойчивости к стрептомицину у стрептококков.— Тезисы докладов IX Междунар. конгресса по микробиологии. М., 1966, с. 29—30.
- Когоутова М. Некоторые регулирующие факторы, участвующие в трансформации.— Тезисы докладов IX Междунар. конгресса по микробиологии. М., 1966, с. 46.
- Кожухарь И. Г., Черномордик А. Б. О предупреждении развития устойчивости к антибиотикам.— «Антибиотики», 1967, № 8, с. 715.
- Козлов Ю. В., Георгиев Г. П. К механизму РНК-полимеразной реакции. Образование комплексов фермента с нерастворимой матрицей.— «Молекулярная биология», 1967, № 2, с. 190—197.
- Корабельников И. Д. К вопросу о применении пепсина при лечении острых нагноений.— «Казанск. мед. журн.», 1927, № 2, с. 199.
- Косачев И. Д. Применение морфоциклина и олеморфоциклина при лечении костных и костно-суставных панарициев: Автореф. дисс. канд. Л., 1970.
- Кофман С. Я., Попкова П. И., Щукина Л. Л. Эффективность лечения легочных больных ингаляциями аэрозолей морфоциклина.— Труды Лен. педиатрич. мед. ин-та, т. 41. Л., 1967, с. 54—59.
- Кравченко Л. С. и др. Влияние тетрациклина на ДНК возбудителя пумороза птиц.— Материалы конф. аспирантов и молодых ученых УНИИБП. Л., 1970, с. 66—71.
- Кравченко Л. С. и др. Действие окситетрациклина на температурную денатурацию ДНК в присутствии различных биологических веществ.— «Антибиотики», 1974, № 3, с. 248—252.
- Кудлай Д., Петровская В., Гладиллин Н. Передача резистентности к стрептомицину с протопластами чувствительных бактерий *Salmonella*.— «Журн. микробиол.», 1961, № 10, с. 25.
- Кудлай Д., Петровская В., Гладиллин И. Трансформация устойчивости к стрептомицину у сальмонелл.— «Журн. микробиол.», 1960, № 8, с. 16.
- Куплевацкая Т. С. Химиотерапевтическая активность тетрамина.— Материалы VI научной сессии ЛНИИА. Л., 1970, с. 98—94.
- Лагерт И. К., Кофман Б. Л., Костин Э. Д. Антибиотикотерапия у больных с острой почечной недостаточностью в акушерстве и гинекологии.— «Клин. мед.», 1969, № 3, с. 54—59.
- Лагерт И. К. и др. Экспериментальное изучение лечебных свойств ферментов микробного происхождения.— В кн.: Ферменты медицинского назначения. Л., 1975, с. 77—82.
- Лазуркин О. С. и др. Изменение устойчивости вторичной структуры ДНК под действием веществ, образующих с ДНК комплексы.— В кн.: Нуклеиновые кислоты. М., 1968, с. 49—58.
- Лебедева М. Н., Воропаева С. Д. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. М., 1960.

- Лебедева С. А. и др. Эффект совмещения в одной бактериальной клетке хромосомных и внехромосомных детерминантов антибиотикоустойчивости.— Тезисы Всесоюзн. конф. «Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов», М., 1973, с. 291.
- Левченко А. Б., Белоусова И. И., Эльгарт Р. Е., Чистякова А. М., Терешин И. М. Влияние биологически активных соединений на устойчивость бактерий к антибиотикам.— «Антибиотики», 1975, № 11, с. 1002—1005.
- Лишнева Е. Б. и др. Действие аминоклюкозидных антибиотиков на стабильность ассоциации рибосомальных субчастиц.— «Докл. АН СССР», 1971, № 3, с. 15—18.
- Луначарская Т. В., Копейко И. П. Интратрахеальное применение морфоциклина.— «Антибиотики», 1968, № 12, с. 1123—1126.
- Макарова Р. А., Чайковская С. М. Полусинтетические пенициллины как ингибиторы действия пенициллиназ.— «Антибиотики», 1963, № 4, с. 323—327.
- Малек П., Кольц Я. Антибиотики основной природы и гепарин.— «Антибиотики», 1960, № 6, с. 10—13.
- Марголин А. М., Пайкин М. Д. Применение морфоциклина у больных нагноительными процессами в легких.— В кн.: Морфология, физиология и патология органов дыхания. Материалы II научн. конф. Л., 1966, с. 93—96.
- Маркович А. В. и др. Химиотерапевтическая эффективность морфолинметилтетрациклина при экспериментальных кокковых инфекциях.— «Антибиотики», 1964, № 4, с. 343—347.
- Миндлин С. З. Конъюгация, сексдукция и элисомы бактерий.— В кн.: Генетика и селекция микроорганизмов. М., 1964, с. 131.
- Михайлец Г. А. и др. К фармакологии олеморфоциклина.— «Антибиотики», 1968, № 12, с. 1066—1070.
- Мороз А. Ф., Бродинова Н. С., Подборонов В. М. Предупреждение развития лекарственноустойчивых форм у стафилококков комбинациями антибиотиков с ДНК-тропными веществами.— «Антибиотики», 1971, № 5, с. 405—408.
- Мороз А. Ф. и др. Изучение действия рифамицина на конъюгационную передачу R-фактора у *E. coli*.— В кн.: Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов. М., 1973, с. 274—276.
- Мороз А. Ф. и др. Конъюгационная передача R-фактора RPI у *Ps. aeruginosa* и ингибирование этого процесса рядом веществ.— Собрание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 28.
- Мужиченко А. М., Финн Г. Р. К вопросу о механизме изменения вирулентности брюшнотифозных бактерий, устойчивых к хлортетрациклину.— «Антибиотики», 1974, № 12, с. 1092—1095.
- Мясникова Г. П. О лечебном действии водорастворимых тетрациклинов при септических пуэрперальных заболеваниях. Автореферат дисс. канд. Л., 1969.
- Навашин С. М., Фомина И. П., Кузнецова С. М. Активность оксациллина в отношении полиустойчивых штаммов стафилококка, выделенных от больных.— В кн.: Полусинтетические производные пенициллина. М., 1968, с. 16—20.
- Навашин С. М., Сазыкин Ю. О. Биохимия фенотипа микроорганизмов с хромосомной и внехромосомной природой антибиотикорезистентности.— «Успехи совр. биол.», 1973, № 3, с. 331—350.
- Навашин С. М., Фомина И. П. Справочник по антибиотикам. М., 1974а.
- Навашин С. М., Фомина И. П. Полусинтетические пенициллины. М., 1974б.
- Нещадим Г. Н. Изучение путей ограничения антибиотикорезистентности у энтеробактерий в эксперименте. Автореф. дисс. канд. М., 1972.
- Пайкин М. Д. Изучение лечебного действия морфоциклина в эксперименте и клинической практике. Автореф. канд. дисс. Л., 1970.

- Пирюзян Л. А. и др. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны. М., 1974.
- Подборонов В. М. Предупреждение развития лекарственноустойчивых форм *E. coli* антибиотики в сочетании с ДНК-тропными веществами.— «Антибиотики», 1972, № 6, с. 539.
- Поляк М. С. Экспериментальная терапия редких вариантов анаэробной газовой инфекции.— «Антибиотики», 1973, № 6, с. 526—529.
- Поляк М. С. и др. Экспериментальное изучение противобактериального действия 7-хлор-7-дезоксилинкомицина.— «Антибиотики», 1972, № 12, с. 1077—1079.
- Поляк М. С. Применение морфоциклина при экспериментальной анаэробной инфекции.— «Восп.-мед. журн.», 1968, № 10, с. 58—59.
- Поляк М. С. Действие морфоциклина, левомицетина и их сочетаний на патогенные клостридии и экспериментальную анаэробную (газовую) инфекцию.— «Антибиотики», 1969, № 10, с. 884—888.
- Пономарева Т. Р., Смолянская А. З. Влияние 5-фторурацила на трансдукцию лекарственной устойчивости у стафилококков.— Собрание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 41.
- Прозоров А. А. Влияние на трансформирующую активность ДНК некоторых веществ, повышающих прочность связей ее нитей.— В кн.: Генетика микроорганизмов. М., 1966, с. 115—123.
- Пронина М. И., Шабунев Б. Е. Мутагенное действие неомицина, стрептомицина и гигромицина В на *Act. hydroscopicus*.— Тезисы докладов конф. по генетике промышленных микроорганизмов, 10—14 декабря 1973, с. 159.
- Ровинская А. Я. Влияние хлорамфеникола и эритромицина на некоторые биологические и физико-химические свойства ДНК. Автореф. дисс. канд. Л., 1973.
- Сазыкин Ю. О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. М., 1968.
- Сазыкин Ю. О. Биохимические механизмы резистентности к ингибиторам белкового синтеза. М., 1972.
- Сазыкин Ю. О. и др. Биохимические механизмы резистентности к антибиотикам — ингибиторам белкового синтеза.— Тезисы докладов Всесоюз. симпозиума «Изучение механизма действия антибиотиков». Л., 1975, с. 71—72.
- Севаг М. Г., Де Курси С. Дж. (Sevag M. G., De Courcy S. J.). Биохимические процессы, лежащие в основе устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам, и биохимические пути предотвращения этой устойчивости.— В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., 1970, с. 369—426.
- Селезнев Е. К. и др. Использование морфолевоциклина в хирургической клинике.— «Вестн. хир.», 1972, № 3, с. 66—70.
- Семич А. И. Комбинированное действие пенициллина и других антибактериальных веществ на брюшнотифозные микробы.— «Журн. микробиол.», 1952, № 7, с. 52—53.
- Сиволодский Е. П. Влияние метисазона (марборана) на передачу конъюгаций, R-фактора у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.— «Антибиотики», 1972, № 12, с. 1091—1094.
- Скавронская А. и др. Действие 5-бромурасила и изменение вирулентности и радиочувствительности сальмонелл при внедрении аналога в их ДНК.— В кн.: Генетика микроорганизмов. М., 1966, с. 54.
- Синская Т. Г., Шуб Г. М. Передача внехромосомного маркера устойчивости к эритромицину у стафилококков в смешанной культуре и влияние на этот процесс некоторых факторов.— Собрание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 60.
- Слоницкая Н. Н. Тератогенное действие гризеофульвина-форте на плод крысы.— «Антибиотики», 1969, № 1, с. 44—48.
- Соловьев В. Н. Стратегия современной химиотерапии бактериальных инфекций. М., 1973.

- Соловьева Н. Н., Терешин И. М., Белоусова И. И. Изучение хлорамфениколазы кишечной палочки и золотистого стафилококка. — «Антибиотики», 1974, № 4, с. 327—331.
- Сорокин В. В. Некоторые пути повышения эффективности действия хлорамфеникола на *E. coli* (возбудителя колибактериоза) в опытах *in vitro* и *in vivo*. Автореф. дисс. канд. Тарту, 1975.
- Стеблюк П. Н. Повышение чувствительности патогенных микробов к антибиотикам при помощи рибонуклеазы. — «Врач. дело», 1973, № 10, с. 150.
- Стент Г. (Stent G.). Молекулярная генетика. М., 1974.
- Стручков В. Н. и др. Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. М., 1970.
- Стручков В. Н. и др. Антибиотики в хирургии. М., 1973.
- Стручков В. И., Григорян А. В., Готищев В. К. Гнойные раны. М., 1975.
- Терешин И. М. Передача устойчивости к хлорамфениколу путем конъюгации. — «Генетика», 1965, № 6, с. 30—36.
- Терешин И. М. Роль ДНК в возникновении и распространении антибиотикоустойчивых бактерий. Автореф. докт. дисс. Л., 1967.
- Терешин И. М., Белоусова И. И. Применение ингибиторов синтеза белка и нуклеиновых кислот для изучения передачи устойчивости к антибиотикам с помощью эписомного фактора (Rtf). — «Генетика», 1965, № 5, с. 38—43.
- Терешин И. М., Белоусова И. И., Шальман С. Л. Межбактериальная передача устойчивости к антибиотикам. — В кн.: Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Ереван, 1969, с. 125.
- Терешин И. М., Белоусова И. И., Эльгарт Р. Е. Межбактериальный перенос эписомной (Rtf) устойчивости к антибиотикам в организме белых мышей. — «Антибиотики», 1969, б. № 8, с. 749—753.
- Терешин И. М., Левченко А. Б., Чистяков А. М., Белоусова И. И. Влияние спермина, спермилина, диметилсульфоксида, додецилсульфата натрия и дезоксихолата натрия на устойчивость бактерий к некоторым антибиотикам. — «Антибиотики», 1974а, № 11, с. 993—997.
- Терешин И. М., Кузина З. А. Температурная денатурация рибосом *Salmonella pullorum* в присутствии некоторых антибиотиков и других биологически активных веществ. — «Антибиотики», 1974, б. № 6, с. 517—522.
- Ткаченко С. С., Поляк М. С., Рабинович И. М. Применение антибиотиков комплексного действия для профилактики и лечения инфекционных осложнений при травме (методические указания). Л., 1973.
- Углов Ф. Г. и др. Применение антибиотиков в хирургической практике. — «Вестн. хир.», 1967, а, № 7, с. 7—12.
- Углов Ф. Г. и др. Применение морфоциклина в брюшной хирургии. — «Вестн. хир.», 1967б, № 9, с. 66—69.
- Фомина И. П. и др. Пенициллиназоустойчивые полусинтетические пенициллины — антибактериальная активность и особенности циркуляции в крови больных. — «Антибиотики», 1971, № 2, с. 153—158.
- Ханина М. Ф. и др. Взаимодействие внехромосомных и хромосомных генов устойчивости к тетрациклинам в клетках *E. coli*. — Совещание по внехромосомной наследственности микроорганизмов. М., 1975, с. 31.
- Харитonenko Т. С. Фармакологическая характеристика оксиглюкоциклина — нового карбоксамидного производного окситетрациклина. — «Антибиотики», 1972, № 3, с. 240—243.
- Хейс В. (Hayes W.). Генетика бактерий и бактериофагов. М., 1965.
- Хочкисс Р. (Hotchkiss R.). Количественные критерии генетической трансформации бактерий. — В кн.: Химические основы наследственности. М., 1960, с. 251—263.
- Хочкисс Р., Оттоленги Е. (Hotchkiss R., Ottolenghi E.). Генетическая трансформация как основа для эволюции бактерий. — V Междунар. биохим. конгресс, симп. М., 1961, с. 34.

- Хурвиц Дж., Огест Дж. (Hurwitz J., August J.). Участие ДНК в синтезе РНК. В кн.: Нуклеиновые кислоты. Под ред. А. Н. Белозерского. М., 1965, с. 74—111.
- Цыганов В. Действие различных сочетаний антибиотиков на микроорганизмы кишечной группы. Автореф. дисс. докт. Л., 1964.
- Шнитцер Р., Грюнберг Э. (Schnitzer R., Grunberg E.). Устойчивость микроорганизмов к лекарственным веществам. М., 1960.
- Шендеров Б. А. Влияние производных 5-нитрофурана на передачу лекарственной устойчивости методом конъюгации.— «Журн. микробиол.», 1971, № 9, с. 77.
- Шеффер П. (Schaeffer P.). Межвидовые взаимодействия при трансформации бактерий.— В кн.: Биологическое воспроизведение макромолекул. М., 1960, с. 96.
- Шорин В. А., Шаповалова С. П. Изучение антибактериальной и химиотерапевтической активности антибиотика рифамицина СВ.— «Антибиотики», 1974, № 1, с. 3—6.
- Шраер Д. П. Экспериментальная стафилококковая инфекция, вызванная культурами, продуцирующими β -лактамазу в условиях действия комбинаций пенициллинов с акридинами или аналогами пенициллина. Автореф. дисс. докт. М., 1975.
- Экземпляров О. Н. Проникновение некоторых антибиотиков в клетки культуры макрофагов и действия их на фагоцитирование бактерий. Автореф. дисс. канд. Л., 1965.
- Abderhalden R. Klinische Enzymologie. Stuttgart, 1958.
- Abe M., Mizuno D. A contribution to the knowledge of *Pneumococcus* transformation during the period between the incorporation of DNA and the appearance of streptomycin resistance.— "Biochim. Biophys. Acta", 1952, v. 32, p. 464—470.
- Abraham E. P., Chain E. Enzyme from bacteria able to destroy penicillin.— "Nature", 1940, v. 146, p. 837—840.
- Abraham E. P. et al. Further observations on penicillin.— "Lancet", 1941, v. 2, p. 177—188.
- Abraham E. P., Newton G. G. F. Comparison of action of penicillinase on benzylpenicillin and cephalosporin N and competitive inhibition of penicillinase by cephalosporin.— "Biochem. J.", 1956, v. 63, p. 628—634.
- Abraham E. P. Biosynthesis and Enzymic Hydrolysis of Penicillins and Sporins. London, 1972.
- Adelberg E. A., Pittard J. Chromosome transfer in bacterial conjugation.— "Bact. Rev.", 1965, v. 29, p. 161—172.
- Ahmed K. A. Nystatin resistance in yeast: isolation of genic and cytoplasmic mutants from a sensitive strain lacking resistance modifiers.— "Egypt. J. Genet. Cytol.", 1972, v. 1, p. 180—195.
- Akiba T. et al. On the mechanism of the development of multiple drug-resistant clones of *Shigella*.— "Japan J. Microbiol.", 1969, v. 4, p. 219—227.
- Akiba T., Iwahara S. Studies on the mechanism of transfer of drug resistance in bacteria. IX. Influence of temperature and pH on resistance transfer.— "Med. a Biol.", 1961, c. 60, p. 42—44 (in Japan).
- Alexander H., Leidy G. Studies on the nature of *Haemophilus influenzae* cells susceptible to heritable changes by DNA.— "J. Expt. Med.", 1954, v. 99, p. 505—509.
- Anderes E. A., Sandine W. E., Elliker P. R. Lipids of antibiotic-sensitive and -resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*.— "Can. J. Microbiol.", 1971, v. 17, p. 1357—1362.
- Anderson E. S. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications.— "Brit. Med. J.", 1968, N 5614, p. 333—338.
- Anderson P. D., Battle H. J. Effects of chloramphenicol on the development of the zebrafish *Brachydanio rerio*.— "Can. J. Zool.", 1967, v. 45, p. 191—196.

- Anderson R. C. Erythromycin.—"J. Am. Pharm. Ass.", 1952, v. 41, p. 555.
- Anderson T., Wollman E., Jacob F. Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *E. coli*.—"Ann. Inst. Pasteur", 1957, v. 93, p. 450—454.
- Antony D., Zeszotek E., Goldtewait D. Studies with the RNA polymerase. I. Factors effecting the binding of nucleic acid polymers to the enzyme.—"Biochim. Biophys. Acta", 1969, v. 174, p. 458—475.
- Apirion D. e. a. *Escherichia coli* reversion from streptomycin dependence, a mutation in a specific 30S ribosomal protein.—"J. Molec. Biol.", 1969, v. 43, p. 327—329.
- Avery O., MacLeod C., MacCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. Introduction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III.—"J. Expt. Med.", 1944, v. 79, p. 137—142.
- Bach M. K., Johnson H. G. Some studies on the antimutagenic action of polyamines.—In: *Progr. Molec. Cell Biol.*, v. 2. Berlin, 1971, p. 329—338.
- Bachrach Y., Ellison G. Interaction of oxidized polyamines with DNA. Effect of DNA composition on the binding.—"Biochim. Biophys. Acta", 1969, v. 179, p. 473—483.
- Balassa R. In vitro induzierte Transformationen bei Rhizobien.—"Naturwissenschaften", 1955, Bd. 42, S. 422—432.
- Balassa R. Über die Transformationen von *Rhizobium*.—"Naturwissenschaften", 1956, Bd. 43, S. 133—138.
- Barber M. Penicillin-resistant and dependent staphylococcal variants.—"J. Gen. Microbiol.", 1953, v. 8, p. 111—113.
- Bard M. Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.—"J. Bact.", 1972, v. 111, p. 649—657.
- Barr F. S., Carman B. E. Synergism and antagonism in antibiotic combinations.—"Antibiot. Chemother.", 1954, v. 4, p. 818—821.
- Barzicalupo P. e. a. Curing of an *E. coli* episome by rifampicin.—"Proc. Nat. Acad. Sci.", 1972, v. 69, p. 298—300.
- Beltrami V., Princiotta M. Combined antibiotic-enzymatic therapy in bronchopulmonary suppurations. Evaluation of clinical radiological and functional results.—"Ann. Ital. Chir.", 1961, t. 38, p. 711—712.
- Bendich A., Wilczok A., Boreafreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis.—"Science", 1965, v. 148, p. 374—380.
- Benveniste R., Yamada T., Davies J. Enzymic adenylation of streptomycin and spectinomycin by resistance factor-resistant *Escherichia coli*.—"Infect. Immun.", 1970, v. 1, p. 100—119.
- Benveniste R., Davies J. Enzymatic acetylation of aminoglycoside antibiotics by *Escherichia coli* carrying an R factor.—"Biochemistry", 1971, v. 10, p. 1787—1796.
- Benveniste R., Davies J. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria.—"Ann. Rev. Biochem.", 1973, v. 42, p. 471—507.
- Bergamini N., Fowst G. Rifamycin SV. A review.—"Arzneim.-Forsch.", 1965, Bd. 15, S. 951—1002.
- Binda G. e. a. Rifampicin, a general review.—"Arzneim.-Forsch.", 1971, Bd. 21, S. 1907—1977.
- Blackwood R. K. e. a. 6-methylenetetraacyclines. I. A new class of tetracycline antibiotics.—"J. Am. Chem. Soc.", 1961, v. 83, p. 2773—2775.
- Bliss E. A., Warth B. T., Long P. H. Studies on combinations of antibiotics in vitro and experimental infections in mice.—"Bull. J. Hopk. Hosp.", 1952, v. 90, p. 149—169.
- Blumberg P. Penicillin binding components of bacterial cells and their relationship to the mechanism of penicillin action.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1974, v. 195, p. 319—325.

- Bödenhoff J. Development of strains of genus *Candida* and genus *Torulopsis* resistant to antibiotics.—"Acta Path. Microbiol. Scand.", 1969, v. 75, p. 622—630.
- Boivin A., Vendrelly R. Role de l'acide desoxyribonucleique hautement polymerise dans le determinisme des caracteres hereditaires des bacteries.—"Helv. Chim. Acta", 1946, v. 29, p. 1338—1348.
- Bouanchaud D., Chabbert Y. Practical effectiveness of agents curing R-factors and plasmids.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 305—311.
- Boudru J. De la resistance des *Candida albicans* a la nystatine.—"J. Pharm. Belg.", 1969, v. 24, p. 162—185.
- Brana H., Hubacek J., König J. The effect of actinomycin D and flavomycin on *Escherichia coli* R⁺ strains.—"Folia Microbiol.", 1973, v. 18, p. 257—262.
- Brickner P. W. Rifampin: clinical studies with a new antibiotic.—"J. Clin. Pharmacol.", 1969, v. 9, p. 243—250.
- Bruns W. Some aspects of methicillin-resistance of *St. aureus*.—Microbiol. Immunol. I. Staphylococci a, Staphylococci Infect., v. III. Basel, 1973, p. 183—192.
- Brzezinska M. e. a. Gentamicin resistance in strains of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by enzymatic N-acetylation of the deoxystreptamine moiety.—"Biochemistry", 1972, v. 11, p. 761—765.
- Campbell A. Transductions and segregation in *Escherichia coli* K-12.—"Virology", 1957, v. 4, p. 366—384.
- Catlin B. Extracellular deoxyribonucleic acid in bacteria and a deoxyribonuclease inhibitor.—"Science", 1956, v. 124, p. 441.
- Černa J., Rycklik I. Cross resistance of *Escherichia coli* B ribosomes to inhibition of the puromycin reaction by erythromycin, spiramycin and chloramphenicol.—"Biochim. Biophys. Acta", 1968, v. 157, p. 436.
- Chabbert Y. A., Baudens J. G., Bouanchaud D. M. Medical aspects of transferable drug resistance.—In: Bacterial episomes and plasmids. (A CIBA Foundation Symposium). London, 1969, p. 227—242.
- Chabbert Y. A., Witchitz J. L. In vivo transfer of a plasmid governing gentamicin resistance.—In: Bacterial plasmids and antibiotic resistance. (I Intern. Symposium). Prague—N. Y., 1972, p. 19—22.
- Chain E. B. Twenty-five years of penicillin therapy in perspective.—"Antimicrobiol. Agents Chemother.", 1965, 1966, p. 1—8.
- Chakrabarty A. M., Gunslaus I. C. CAM plasmid in pseudomonads: transfer polarity and genetic circularity.—"Bact. Proc.", 1971, v. 71, p. 46.
- Chandra P., Zimmer Ch., Thrum H. Effect of distamycin on the structure and template activity of DNA in the RNA-polymerase.—"FEBS Letters", 1970, v. 7, p. 90—94.
- Chargaff E., Schulman H., Schapiro H. Protoplasus of *E. coli* as sources and acceptors of DNA, rehabilitation of a deficient mutant.—"Nature", 1957, v. 180, p. 851—858.
- Cho J.-J., Panopoulos N. J., Schroth M. N. Genetic transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant-pathogenic *Erwinia* species.—"J. Bact.", 1975, v. 122, p. 192—198.
- Cohen M. The specific effects of streptonigrin activity on human chromosomes in culture.—"Cytogenetics", 1963, v. 2, p. 271—275.
- Cohen S., Sweeney H. Transduction of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* dependent on an usual specificity of the recipient strain.—"J. Bact.", 1970, v. 104, p. 1158—1161.
- Cole M., Sutherland R. The role of penicillin acylase in the resistance of gram-negative bacteria to penicillins.—"J. Gen. Microbiol.", 1966, v. 42, p. 345—356.
- Cole M., Elson S., Fullebrock P. Inhibition of the beta-lactamases of *E. coli* and *Klebsiella aerogenes* by semi-synthetic penicillins.—"Biochem. J.", 1972, v. 127, p. 295—308.

- Concillo C., Tezzo A., Gerlotto T. Esters of chloramphenicol II.—
"Farmaco", Ed. sci., 1958, t. 13, p. 393—398.
- Dan M., Burt M., Weinstein L. In vitro studies of the activity of coumermycin A1 against staphylococci resistant to methicillin and cephalothin.—"J. Infect. Dis.", 1969, v. 120, p. 488—490.
- Daniels P. J. e. a. Gentamycin derivatives modified at the 2 position. The preparation of 2-epi-gentamicin C, and 2-deoxygentamicin C₂.—
"J. Antibiot.", 1974, v. 27, p. 150—154.
- Datta N., Lawn A. W., Meynell E. The relationship of F-type piliation and F phage sensitivity to drug resistance transfer in R⁺F⁻ Escherichia coli K-12.—"J. Gen. Microbiol.", 1966, v. 45, p. 365—376.
- Datta N. Transferable antibiotic resistance in E. coli.—"Proc. Roy. Soc. Med.", 1971, v. 64, p. 533—537.
- Davis C., Anandan J. The evolution of R-factor.—"New Engl. J. Med.", 1970, v. 282, p. 117—122.
- Demerec M., Hartman P. E. Complex loci in microorganisms.—"Ann. Rev. Microbiol.", 1959, v. 13, p. 377—406.
- Diakos G. e. a. Clinicolaboratory evaluation of cephalixin, a new oral cephalosporin.—"Brit. J. Clin. Pract.", 1970, v. 24, p. 379—386.
- Dixon J. M. S., Lipinski A. E. Resistance of group A beta-hemolytic Streptococcae to lincomycin and erythromycin.—"Antimicrob. Agents Chemother.", 1972, v. 1, p. 333—339.
- Dobzaneskii W. Effects of chloramphenicol on UV-induced streptomycin, novobiocin and penicillin-resistance in Staph. aureus.—209 P. —"Bull. Acad. Polon.", Sec. 12, 1964, p. 561—568.
- Egawa R., Hashimoto H., Mitsuhashi S. Inhibition of R factor transfer by chemical agents.—"Jap. J. Bact.", 1961, v. 16, p. 703—704 (in Japan).
- Egawa R., Sawai T., Mitsuhashi S. Drug resistance to enteric bacteria. XII. Unique substrate specificity of penicillinase produced by R factor.—"Jap. J. Microbiol.", 1967, v. 11, p. 173—178.
- Ellen G., Bachrach Y. Interaction of oxidized polyamines, mono- and poly-nucleotides.—"Biochim. Biophys. Acta", 1969, v. 179, p. 464—472.
- Endler F. Zur Lokabehandlung der Osteomyelites mit Fermenten.—"Klin. Med.", 1956, Bd. 11, S. 355—356.
- Ephrussi-Taylor H. Etude de la recombinaison á l'échelle moléculaire dans la transformation bactérienne.—"J. Chim. Phys., Phys. Chim. Biol.", 1961, t. 58, p. 1091—1099.
- Feingold D., Hsu Chen C., Sud J. Basis for the selectivity of action of the polymyxin antibiotics on cell membranes.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1974, v. 195, p. 480—492.
- Fleming P., Galdner M., Glass D. Inhibition of aerobacter cephalosporin beta-lactamase by penicillins.—"J. Bact.", 1969, v. 98, p. 394—397.
- Franklin T. J. Uptake of tetracycline by membrane preparations from E. coli.—"Biochem. J.", 1971, v. 123, p. 267—272.
- Fredericq P., Krémery V., Kettner M. Transferable colicinogenic factors as mobilizing agents for extrachromosomal Sm-resistance.—"Z. Allg. Mikrobiol.", 1971, Bd. 11, S. 11—17.
- Fryberg, Oehlischlager A. C., Unran A. M. Sterol biosynthesis in antibiotic resistant yeast.—"Arch. Biochem. Biophys.", 1974, v. 160, p. 83—89.
- Furness G., Rowley O. Transduction of virulence within the species Salmonella typhimurium.—"J. Gen. Microbiol.", 1956, v. 15, p. 140—145.
- Gale E. F. The release of potassium ions from Candida albicans in the presence of polyene antibiotics.—"J. Gen. Microbiol.", 1974, v. 80, p. 451—465.
- Garrod L. P. Choice among penicillins and cephalosporins.—"Brit. Med. J.", 1974, v. 3, p. 96—100.
- Ginoza H., Painter R. Genetic recombination between the resistance

- transfer factors and the chromosome of *E. coli*.—*"J. Bact."*, 1964, v. 87, p. 1339—1345.
- Goddard J., Weiss J. Studies on RNA synthesis primed by damaged templates. DNA templates damaged by DNAS treatment and by radiation.—*"Biochim. Biophys. Acta"*, 1970, v. 199, p. 126—138.
- Godgal S. Studies on transformation of *Hemophilus influenzae*. IV. Linked and unlinked transformations.—*"J. Gen. Physiol."*, 1961, v. 45, p. 205—209.
- Goss W. A., Deitz W. H., Cook T. M. Mechanism of action of nalidixic acid in *Escherichia coli*. II. Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis.—*"J. Bact."*, 1965, v. 89, p. 1068—1074.
- Griffith F. Significance of pneumococcal types.—*"J. Hyg."*, 1928, v. 27, p. 113—119.
- Grindley J. N., Grindley D. F., Anderson E. S. Acridine treatment of F⁺ and M⁺ strains of *E. coli* K-12 carrying a neomycin-kanamycin resistance determinant.—*"Genet. Res."*, 1970, v. 15, p. 327—334.
- Gross R., Holzman R. Effect of EDTA on penicillinase uninductibility in *Staph. aureus*.—*"Med. J. Austr."*, 1970, v. 1, p. 482.
- Grosswicz N., Ariel M. Mechanism of protection of cells by spermine against lysozyme-induced lysis.—*"J. Bact."*, 1963, v. 85, p. 293—300.
- Guinee P. A. M. R-transfer to *S. panama* in vitro and in vivo.—*"Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol."*, 1968, v. 34, p. 03—98.
- Hahn F., Ciak J. Elimination of bacterial episomes by DNA-complexing compounds.—*"Ann. N. Y. Acad. Sci."*, 1971, v. 182, p. 295—304.
- Hahn F. E., Washington D. C. Acquired Resistance of Microorganisms to Chemotherapeutic Drugs. Basel — München — Paris — London — New York — Sidney, 1976.
- Hamilton-Miller J. M. Modes of resistance to benzylpenicillin and ampicillin in twelve *Klebsiella* strain.—*"J. Gen. Microbiol."*, 1965, v. 41, p. 175—184.
- Hamilton-Miller J. M. Sterols from polyene resistant mutants of *Candida albicans*.—*"J. Gen. Microbiol."*, 1972, v. 73, p. 201—203.
- Hamilton-Miller J. M. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics.—*"Bact. Rev."*, 1973, v. 37, p. 166—196.
- Hamilton-Miller J. M. Comparative activity of ampicillin and seven cephalosporins against group D streptococci.—*"J. Clin. Path."*, 1974, v. 27, p. 828—831.
- Hamilton-Miller J. M., Smith J. T., Knox R. Interaction of cepharidine with penicillinase producing gram-negative bacteria.—*"Nature"*, 1965, v. 208, p. 235—237.
- Hane M. W., Wood T. H. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies.—*"J. Bact."*, 1969, v. 99, p. 238—241.
- Harada K. e. a. Transduction of transmissible drug-resistance (R) factors with phage epsilon.—*"J. Bact."*, 1963, v. 86, p. 1332—1338.
- Harada K. e. a. Drug resistance of enteric bacteria. III. Acquisition of transferability of nontransferable R(TC) factor in cooperation with F factor and formation of FR(TC).—*"J. Bact."*, 1964, v. 88, p. 1257—1265.
- Harada K. e. a. Drug-resistance of enteric bacteria. VIII. Chromosomal location of nontransferable factor R in *Escherichia coli*.—*"J. Bact."*, 1967, v. 93, p. 1236—1241.
- Harada K. e. a. Drug resistance of enteric bacteria. X. Combination of defective R(CT) factor with other episomes.—*"Jap. J. Microbiol."*, 1976b, v. 11, p. 143—151.
- Harding J. Flucloxacillin in the treatment of skin and soft tissue infections.—*"Practitioner"*, 1970, v. 205, p. 801—806.
- Harford L. N., Merglay M. Interspecific transformation on rifampicin resistance in the genus *Bacillus*.—*"Molec. Gen. Genet."*, 1973, v. 120, p. 151—155.

- Hashimoto H., Oshima H., Mitsuhashi S. Drug resistance of Staphylococci. IX. Inducible resistance to macrolide antibiotics in Staphylococcus aureus.—"Jap. J. Microbiol.", 1968, v. 12, p. 321—327.
- Hayashi K. e. a. Изучение веществ, влияющих на эпизомную систему инфекционного переноса. I. Соотношение между ингибирующим действием производных акридина на перенос множеств. лекарств резистентности и хим. структурой.—"Jap. J. Bact.", 1965a, v. 20, p. 498—504.
- Hayashi K. e. a. Изучение веществ, влияющих на эпизомную систему инфекционного переноса. II. Соотношение между химической структурой производных триметиламмония и их действием на перенос множественной лекарственной резистентности.—"Jap. J. Bact.", 1965b, v. 21, p. 541—551.
- Hedges R. W., Datta N. R factors giving chloramphenicol resistance.—"Nature", 1971, v. 234, p. 220—221.
- Helling R. B., Kukora J. S. Nalidixic acid-resistant mutants of Escherichia coli deficient in isocitrate dehydrogenase.—"J. Bact.", 1971, v. 105, p. 1224—1226.
- Hermans P. e. a. Laboratory and clinical evaluation of cephaloridine, a cephalisropin derivative.—"Antimicrob. Agents. Chemother.", 1965, p. 878—887.
- Higuchi T., Bolton S. The solubility and complexing properties of oxytetracycline and tetracycline. III.—"J. Am. Pharm. Ass. Sci.", 1959, v. 48, p. 557—564.
- Hinshelwood C. N. Chemical Kinetics of the Bacterial Cell. Oxford, 1946.
- Hirota Y., Ligima T. Acriflavine as an effective agent for elimination of F-factor in Escherichia coli.—"Nature", 1957, v. 180, p. 655—662.
- Hirota Y. e. a. Effect of drug-resistance factor R on the properties of Escherichia coli.—"J. Bact.", 1964, v. 87, p. 341—351.
- Hirschman S. Z., Leng M., Felsenfeld G. Interaction of spermine and DNA.—"Biopolymers", 1967, v. 5, p. 227—233.
- Hopper M. W. e. a. Duration of therapeutic effectiveness of nafcillin compared with potassium penicillin G, methicillin and oxacillin.—"Antimicrobiol. Agents Chemother.—1962", 1963, p. 362—368.
- Hori M. e. a. Requinomycin, an inhibitor of R-factor transfer: isolation, characterization and properties.—"J. Antibiot.", 1972, v. 25, p. 393.
- Hotchkiss R. Bacterial transformation. (Symp. Genetic Recombinat.).—"J. Cell Comp. Physiol.", 1954, v. 45, p. 1—8.
- Hotchkiss R. The genetic chemistry of the pneumococcal transformations.—"Harvey Lectures", 1955, v. 49, p. 124.
- Huang R. C. C., Bonner J., Murray K. Physical and biological properties of soluble nucleohistones.—"J. Molec. Biol.", 1964, v. 8, p. 54—64.
- Ikeda D. e. a. Synthesis of 3',4'-dideoxybutizosin.—"J. Antibiot.", 1973a, v. 26, p. 307—309.
- Ikeda D. e. a. Synthesis of 3'-deoxyribostamycin.—"J. Antibiot.", 1973b, v. 26, p. 799—801.
- Ikeda Y., Iijime T., Tajime K. Elimination of F-episome from a male strain of E. coli by treatment with sarkomycin and a related antibiotics.—"J. Gen. Appl. Microbiol.", 1967, v. 13, p. 247—254.
- Imsande J., Zyskind J. W., Mile I. Regulation of staphylococcal penicillinase synthesis.—"J. Bact.", 1972, v. 109, p. 122—133.
- Ingram L. e. a. A transmissible resistance element from a strain of Pseudomonas aeruginosa containing no detectable extrachromosomal DNA.—"J. Gen. Microbiol.", 1972, v. 72, p. 269—279.
- Inoue M., Hashimoto H., Mitsuhashi S. Mechanism of tetracycline resistance in strain of Staphylococcus aureus.—"J. Antibiot.", 1969, v. 23, p. 68—74.
- Inoue M. e. a. Transduction analysis of the genetic determinant for chloramphenicol resistance in staphylococci.—"Jap. J. Microbiol.", 1970, v. 14, p. 261—268.

- Inzuka N. e. a. Specific action of sodium dodecyl sulphate on the sex factor of *E. coli* K-12Hfr strains.—"J. Bact.", 1969, v. 100, p. 827—835.
- Jacob F., Wollman B. L. Sexuality and the Genetics of Bacteria N. Y.—London, 1962.
- Jannes A. The experiments on transformation of *Escherichia coli* and *Bac. subtilis*.—"Acta Path. Microbiol. Scand.", 1962, v. 154, p. 327—339.
- Jarolmen H. Experimental transfer of antibiotic resistance in swine.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 72—79.
- Jawetz E. Combined antibiotic action.—"Biochem. of antibiot.", 1958, v. 64, p. 91—103.
- Jawetz E., Gunnison I. B. Studies on antibiotics synergism and antagonism: a science of combined antibiotic action.—"Science", 1950, v. 111, p. 254—256.
- Johnston J. H., Richmond M. H. The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staph. aureus* in the presence of rifampicin.—"J. Gen. Microbiol.", 1970, v. 60, p. 137—139.
- Jorgensen S. Elimination of antibiotic resistance factors from *E. coli* exposed to anthelmintics.—"Acta Path. Microbiol. Scand", 1974, v. 82, section B Microbiology and immunology, p. 143—144.
- Jukes T. The present status and background of antibiotics in the feeding of domestic animals.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 362—379.
- Kagiwada S., Kato S., Kokugo H. Цит. по Т. Watanabe, 1963.
- Kaji H., Tanaka Y. Binding of dihydrostreptomycin to ribosomal subunits.—"J. Molec. Biol.", 1968, v. 32, p. 221—230.
- Kameda M. e. a. Formation of transferable drug resistance factor by recombination between resistance determinants and transfer factors.—"Japan. J. Bact.", 1969, v. 90, p. 1174—1181.
- Kasik J. E., Weber M., Frechill P. J. The effect of the penicillinase-resistant penicilline and other chemotherapeutic substances on penicillinase of RIRV strain of *Mycobacterium tuberculosis*.—"Am. Resp. Dis.", 1967, v. 95, p. 12—19.
- Kasuya M. Transfer of drug resistance between enteric bacteria induced in the mouse intestine.—"J. Bact.", 1964, v. 88, p. 32—40.
- Kauffmann F. On transduction of serological properties in *Salmonella* group.—"Acta Path. Microbiol. Scand.", 1953, v. 33, p. 409—420.
- Kawaguchi H. e. a. BB-K8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic.—"J. Antibiot.", 1972, v. 25, p. 695—708.
- Kayser F. H. e. a. Experimental and clinical aspects of resistance determinants. Mode of resistance against beta-lactam antibiotics in staphylococci.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 106—117.
- Kayser F. H., Felix M., Wüst I. Chromosomale and extrachromosomale Resistenzmarker bei methicillin-resistenten *Staphylokokken*.—"Path. Microbiol.", 1972, v. 38, p. 27—28.
- Kazuo N., Tanaka N., Umezawa H. Inhibition of nucleic acid biosynthesis in cell-free system of *E. coli* by pluramycin.—"J. Biochem.", 1970, v. 67, p. 655—660.
- Keizo U., Shimizu M. Studies on mitomycin.—"Jap. J. Antibiot.", 1971, v. 24, p. 180—190.
- Kersten W., Kersten H., Szybalski W. Physicochemical properties of complexes between deoxyribonucleic acid and antibiotics which affect of complexes between deoxyribonucleic acid and antibiotics which affect ribonucleic acid synthesis (actinomycin, daunomycin, cinerubin, nogalamycin, chromomycin, mithracin, and olivomycin).—"Biochemistry", 1966, v. 5, p. 236—244.
- Kim S. I., Kwan-Chung K. I. Polyene resistant mutants of *Aspergillus fennelliae*.—"Antimicrob. Agents Chemother.", 1974, v. 6, p. 102—112.
- Kimmelman L., Zinsser H., Klein M. Effect of combined therapy on emergence of drug resistant bacteria in urinary tract infections.—"J. Urol.", 1951, v. 65, p. 668—672.

- Kimura R. The transformation of Salmonella.—"Jap. J. Bact.", 1956, v. 11, p. 199—206.
- Klastersky I., Bermer J., Donean D. Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to combinations of antibiotics.—"Path. Biol.", 1972, v. 20, p. 643—647.
- Klein P., Kimellman Z. The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the Shigella.—"J. Bact.", 1947, v. 52, p. 471—479.
- Khüzel F. Microbiological characteristic of rimactame.—In: A Symposium on Rimactane. Basel, 1968, p. 9—14.
- Kohn K. W. Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules.—"Nature", 1961, v. 191, p. 1156—1158.
- Kohn R. W., Spears C. L. Reaction of anthramycin with deoxyribonucleic acid.—"J. Molec. Biol.", 1970, v. 51, p. 551—572.
- Kondo S. e. a. Isolation of kanamycin and paromamine inactivated by Escherichia coli carrying R factor.—"J. Antibiot.", 1968, v. 21, p. 22—29.
- Kono M. e. a. Drug resistance of staphylococci. XI. Induction of chloramphenicol resistance by its derivatives and analogues.—"J. Antibiot.", 1969, v. 22, p. 603—607.
- Kontomichalou P. Studies on resistance transfer factors. II. Transmissible resistance to eight antimicrobial drugs in a strain of E. coli.—"Path. Microbiol.", 1967, v. 30, p. 185—200.
- Kosagana Yu. e. a. Local indidwinding of DNA during RNA synthesis in vivo.—"Nature New Biol.", 1971, v. 231, p. 212—214.
- Kostrzenski W., Paklerska-Pobratyn H. Dozianie bakteriobójcze streptomycyny na prakty kwasoporne w obecności 4'-chloroamlicy kwazu-5-chloro-salicylowego.—"Gruzlica", 1973, r. 41, l. 819—824.
- Koyama G. e. a. The crystal structure of kanamycin.—"Tetrahedron Lett.", 1968, N 1, p. 1875—1879.
- Krcmery V. The activity of oxytetracycline upon electron transport and energy metabolism in bacteria.—In: Intern. Symp. Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika. Berlin, 1967, S. 169—176.
- Kurashige S. e. a. In vivo induction of resistance to macrolide antibiotics in staphylococci with erythromycin.—"Jap. J. Microbiol.", 1972, v. 16, p. 21—25.
- Kury G., Craig J. The effect of mitomycin C on developing chicken embryos.—"J. Embriol. Exp. Morphol.", 1967, v. 17, p. 222—226.
- Lederberg J., Lederberg E. Replica plating and indirect selection of bacteria mutants.—"J. Bact.", 1952, v. 63, p. 399—404.
- Lederberg J., Tatum B. Gene recombination in E. coli.—"Nature", 1946, v. 158, p. 558—570.
- Ledoux L. Uptake of DNA by living cells.—"Progr. Nucl. Ac. Res.", 1965, v. 5, p. 231.
- Lenhart K. Mutagenic effect of griseofulvin.—"Mykosen", 1969, Bd. 12, S. 687—693.
- Leonard S. G., Colon I. E., Cole R. M. Transduction in group A Streptococcus.—"Biochim. Biophys. Res. Comm.", 1968, v. 30, p. 130.
- Levie L. Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by EDTA.—"J. Biol. Chem.", 1968, c. 243, p. 2373.
- Levy S. B. The problems of drug-resistant pathogenic bacteria. Studies on R factors segregated into E. coli minicells.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 217—225.
- Lewis R., Meyer R., Kraus L. Antibacterial activity of Selected Beta-Lactam and Aminoglycoside Antibiotics Against Cephalotin-Resistant Enterobacteriaceae.—"Antimicrob. Agents a. Chemother.", 1976, v. 9, p. 780—786.
- Lin Feng Kai, Coriel L. The effect of combined antibiotics on the in vitro emergence of staphylococci resistant to novobiocin.—"Antibiot. Med Clin. Ther.", 1957, v. 4, p. 35—39.

- Long P. H. e. a. The experimental background and clinical use of antibiotics.—"Lancet", 1950, v. 258, p. 1139—1147.
- Lowbury E. J. L., Liffe A. Y. Drug Resistance in Antimicrobial Therapy. Springfield, 1974.
- Luria S., Delbrück W. Mutations in bacteria from virus sensitivity to virus resistance.—"Genetics", 1943, v. 28, p. 491—500.
- Maclea S. H., Rogers K. B., Fleming A. Mand B 693 and pneumococci.—"Lancet", 1939, v. 1, p. 562—568.
- Nahler H. R., Mehrotra B. D., Sharp C. W. Effects of diamines on the thermal transition of DNA.—"Biochim. Biophys. Commun.", 1961, v. 4, p. 79—82.
- Malke H. Genetics of resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in natural mutants of *Strept. pyogenes*.—"Molec. Gen. Gen.", 1974, v. 135 p. 349—367.
- Mandi I., Beladi I. Effect of rifampicin and its derivatives on the transfer of R-factor in *E. coli*.—"Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.", 1974, v. 21, p. 385—389.
- Manten A. Synthesis and antagonism between antibiotic mixtures.—"Antibiot. Chemother.", 1954, v. 4, p. 1228—1233.
- Manten A. The action of antibiotic combination on pathogenic staphylococci in vitro.—"Antibiot. Chemother.", 1956, v. 6, p. 480—486.
- Mao J. C. H., Putterman M. The intramolecular complex of erythromycin and ribosome.—"J. Molec. Biol.", 1969, v. 44, p. 347—361.
- Mathison G. E. The effect of chloramphenicol on mitosis of phytochemagglutinin stimulated human leukocytes.—"Nature", 1968, v. 219, p. 405—407.
- Matsushiro A. Specialized transduction of the tryp gene by the temperate phage 80.—"Biken's J.", 1961, v. 4, p. 141—144.
- Mauzy W., Braun W., Whallon J. Extracellular DNA from cultural medium of *Brucella bovis*.—"Bact. Proc.", 1955, v. 69, p. 46—52.
- Meynell E., Datta N. Sex factor activity of drug-resistance factors.—In: Ciba Foundation Symposium on Bacterial Episomes and Plasmids, 1969, p. 120—133.
- Meynell E., Meynell G., Datta N. Phylogenetic relationship of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids.—"Bact. Rev.", 1968, v. 32, p. 55—67.
- Mitsubishi S. Epidemiology and genetics of R-factors.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 141—152.
- Mitsubishi S. Transmissible drug-resistance factor R.—"Protein, Nucleic Acid, Enzyme", 1963, v. 8, p. 216—228 (in Japan.).
- Mitsubishi S. Transmissible drug-resistance factor R.—"Gumma J. Med.", 1966, v. 14, p. 169—209.
- Mitsubishi S., Egawa R., Hashimoto H. Inhibition of conjugal transfer of R-factor by nalidixic acid.—In: Abstracts of the IX International Congress for Microbiology. Moscow, 1966, p. 549—552.
- Mitsubishi S., Hashimoto H., Suzuki K. Drug resistance of enteric bacteria. XIII. Distribution of R-factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock.—"J. Bact.", 1967a, v. 94, p. 1166—1169.
- Mitsubishi S., Kono M., Harada K. Chloramphenicol resistance and inactivation of the drug.—5th Intern. Congr. Chemother. Wien, 1967b, p. 499—509.
- Mitsubishi S., Iyobe S., Hashimoto H. Preferential inhibition of the growth of *Escherichia coli* strain carrying episome.—"J. Antibiot.", 1970a, v. 28, p. 319—323.
- Mitsubishi S. e. a. Drug resistance of staphylococci. X. Induction of chloramphenicol resistance by its derivatives.—"Gumma Rep. Med. Sci.", 1970b, v. 1, p. 222.
- Mitsubishi S. e. a. Preferential effects of antibiotics on *E. coli* strains carrying plasmids.—"J. Antibiot.", 1974, v. 9, p. 682—684.
- Mitus J. In vitro effect of chloramphenicol on chromosomes.—"Blood", 1970, v. 35, p. 689—694.

- Moria R. B. e. a. Chemistry of cephalosporin antibiotics, 1,7-amino cephalosporanic acid from cephalosporin.—"J. Chem. Soc.", 1962, v. 84, p. 3400—3408.
- Morse M. L., Lederberg E. M., Lederberg J. Transductional heterogenotes in *Escherichia coli*.—"Genetics.", 1956, a, v. 41, p. 758—779.
- Morse M. L., Lederberg E. M., Lederberg J. Transduction in *E. coli*.—"Genetics", 1956b, v. 41, p. 142—156.
- Moss J. N. e. a. Effect of trypsin on wound healing.—"Arch. Int. Pharmacodyn.", 1957, v. 110, p. 375—379.
- Murray R. e. a. Development of streptomycin resistance of gramnegative bacilli in vitro and during treatment.—"Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.", 1964, v. 63, p. 470—474.
- Muschel L., Gustafson L. Antibiotic, detergent and complement sensitivity of *Salm. typhi* after EDTA treatment.—"J. Bact.", 1968, v. 95, p. 2010—2018.
- Nagai Y., Mitsuhashi S. New type of R factors incapable of inactivating chloramphenicol.—"J. Bact.", 1972, v. 100, p. 1—7.
- Nakajima T. e. a. Genetic properties of transfer (T) factors.—"Japan J. Microbiol.", 1970, v. 14, N 1, p. 36—41.
- New H., Winshell E. Lack of synergy of EDTA with antimicrobials in resistant *Enterobacteriaceae*.—"Nature", 1970, v. 225, p. 763—765.
- Nielsen M. S. Effects of amphotericin B in vitro of perfect and imperfect strains of *Allescheria boydii*.—"Appl. Microbiol.", 1967, v. 15, p. 86—91.
- Nishida M. e. a. Cefazolin, a new semisynthetic cephalosporin antibiotic.—"J. Antibiot.", 1970, v. 23, p. 137—148.
- Nomura M., Erdan V. A. Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components.—"Nature", 1970, v. 228, p. 744.
- Novick R. P. Penicillinase plasmids of *Staph. aureus*.—"Fed. Proc.", 1967, v. 27, p. 29—38.
- Novick R. P., Morse S. L. In vivo transmission of drug resistance factors between strains of *Staph. aureus*.—"J. Exp. Med.", 1967, v. 125, p. 45—47.
- O'Brien R. W., Morris J. G. The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium scetobutylicum*.—"J. Gen. Microbiol.", 1971, v. 67, p. 265—271.
- Okamoto S., Mizuno D. Mechanism of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Escherichia coli*.—"J. Gen. Microbiol.", 1964, v. 35, p. 125—133.
- Osawa S. e. a. Chloramphenicol resistant mutants of *Bacillus subtilis*.—"Molec. Gen. Genet.", 1973, v. 127, p. 163—173.
- Otaka E. e. a. Ribosomes from erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* 013.—"J. Molec. Biol.", 1970, v. 48, p. 499—510.
- Otaka E. e. a. Peptide analyses of a protein component 50-E of 50S ribosomal subunit from erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* and *Escherichia freundii*.—"Molec. Gen. Genet.", 1972, v. 114, p. 14—22.
- Otaya H. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics.—"J. Antibiot.", 1974, v. 27, p. 686—695.
- Ott J. L., Godzeski C. W. Resistance and cross-resistance of *Staph. aureus*, *E. coli*, *Aerobacter* sp. to cephalosporins and semisynthetic penicillins.—"Antimicrob. Agents. Chemother.", 1966, 1967, p. 75—81.
- Ott J., Shopt L., Holmes D. In vitro and in vivo methodology for detecting and evaluating inhibitors of transfer of resistance factors.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 312—321.
- Ottolenghi E., Hotchkiss R. Appearance of genetic transforming activity in pneumococcal cultures.—"Science", 1960, v. 132, p. 1257—1262.
- Ottolenghi E., McLeod C. Genetic transformation among living pneumococcus in the mouse.—"Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1963, v. 50, p. 417—420.
- Pakula R., Huder Z., Hulanicka E. Studies on transformation of streptococci.—"Bull. Acad. Polon. Sci.", 1958, v. 6, p. 319—323.

- Pakula R., Walczak W. On the nature of competence of transformable streptococci.—"J. Gen. Microbiol.", 1963, v. 31, p. 125.
- Pallanza R., Fürenz S., Timbal M. In vitro bacteriological studies on rifamycin D diethylamide (rifamide).—*"Arzneim.—Forsch."*, 1965, Bd. 15, S. 800—807.
- Pato M., Brown I. Mechanisms of resistance of *E. coli* to sulfonamides.—*"Arch. Biochem. Biophys."*, 1963, v. 103, p. 443—450.
- Pearce L., Meynell E. Specific chromosomal affinity of a resistance factor.—*"J. Gen. Microbiol."*, 1968, v. 50, p. 159—164.
- Pekowski M., Wiedzki P., Kozlowsky J. Badania in vitro wrażliwości na nystatynę drożdżaków z rodzaju *Candida*.—*"Prz. dermatol."*, 1972, r. 59, l. 365—370.
- Perry D., Slade H. Transformation of streptococci to streptomycin resistance.—*"J. Bact."*, 1962, v. 83, p. 443—448.
- Philson J., Clancy C., Alexander J. Cephalothin therapy in bacterial infections.—*"Antimicrob. Agents Chemother."*, 1963, 1964, p. 267—270.
- Pinney R., Smith J. R-factor elimination by thymine starvation.—*"Genet. Res."*, 1971, v. 18, p. 173—179.
- Pinney R., Bremer K., Smith J. R-factor elimination by inhibitors of thymidylate synthetase (fluorodeoxyuridine and showdomycin) and the occurrence of single strand breaks in plasmid DNA.—*"Molec. Gen. Genet."*, 1974, v. 133, p. 163—170.
- Rawal B. EDTA-induced variations in *St. aureus* suppression of growth and antibiotic resistance.—*"Canad. J. Pharm. Sci."*, 1971, v. 6, p. 22—28.
- Reid P., Speyer J. Rifampicin inhibition of ribonucleic acid and protein synthesis in normal and EDTA-treated *E. coli*.—*"J. Bact."*, 1970, v. 104, p. 376—389.
- Richmond M. Resistance factors and their ecological importance bacteria and to man.—*"Progr. Nucl. Acid Res. Molec. Biol."*, 1973, v. 13, p. 191—248.
- Richmond M. N., Jack G. W., Sykes R. B. Mechanisms of drug resistance. The beta-lactamases of gram-negative bacteria including *Pseudomonas*.—*"Ann. N. Y. Acad. Sci."*, 1971, v. 182, p. 243—257.
- Piley M., Pardee A. Nutritional effects on frequencies of bacterial recombination.—*"J. Bact."*, 1962, v. 83, p. 1332.
- Robbins W., Tompsett R. The treatment of endocarditis.—*"Am. J. Med."*, 1951, v. 10, p. 278—290.
- Roland F., Stuart C. The effects of disrupted *E. coli* on *Salmonella*.—*"Antibiot. a. Chemother."*, 1951, v. 1, p. 530—536.
- Rolee R., Ephrussi-Taylor H. Density differences between genetic markers in pneumococcal transforming principle.—*"Proc. Nat. Acad. Sci. USA"*, 1961, v. 47, p. 1450—1459.
- Rosdahl N., Thomsen V. The activity of carbenicillin against gram-negative rods compared with that of penicillin, ampicillin and cephalosporins.—*"Chemotherapy"*, 1970, v. 15, p. 137—147.
- Rownd R., Nakaya R., Nakamura A. Molecular nature of the drug-resistance factors of the Enterobacteriaceae.—*"J. Molec. Biol."*, 1966, v. 17, p. 376—393.
- Rownd R., Kasamatsu H., Mickel S. The molecular nature and replication of drug resistance factors of the Enterobacteriaceae.—*"Ann. N. Y. Acad. Sci."*, 1971, v. 182, p. 168—206.
- Savath L. D., Jago M., Abraham E. P. Cephalosporinase and penicillinase activities of a β -lactamase from *Pseudomonas pyocyanea*.—*"Biochem. J."*, 1965, v. 96, p. 739—752.
- Savath L. D. e. a. Synergistic penicillin combinations for treatment of human urinary-tract infections.—*"Antimicrob. Agents. Chemother."*, 1966, v. 6, p. 149—155.
- Savath L. D. e. a. Altered cell walls of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin.—*"Nature"*, 1971, v. 225, p. 1074—1086.

- Sanfili P. O. A. Activity of distramycin A on the transfer of drug resistance in gram-negative clinical isolated.—*Ann. Med. Sci.*, 1971, v. 182, p. 322—328.
- Satoschi M. Inhibition of DNA-dependent RNA-polymerase reaction of *E. coli* by an antimicrobial natibitic, streptovaricin.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1968, v. 152, p. 341—345.
- Sawai T., Mitsuhashi S., Yamagishi S. Comparison of the chromosomal and extrachromosomal genetic determinants controlling staphylococcal penicillinase production.—*Japan. J. Microbiol.*, 1968, v. 12, p. 531—533.
- Schak J. Deoxyribonucleases of mouse tissues.—*J. Biol. Chem.*, 1954, v. 226, p. 573—575.
- Schneider H., Formal S., Baron L. Experimental genetic recombination in vivo between *E. coli* and *Salm. typhimurium*.—*J. Exp. Med.*, 1961, v. 114, p. 141—146.
- Schonell M., Dorken E., Grzybowski S. Rifampin.—*Can. Med. Ass. J.*, 1972, v. 106, p. 783—788.
- Sensi P. Structural modification of antibiotics: present status and perspectives.—*Post. Hig. Med. Dosw.*, 1974, r. 28, l. 605—626.
- Sevag M. G., Drabble W. T. Prevention of the emergence of drug-resistant bacteria by polyamines.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1962, v. 8, p. 446—454.
- Sevag M. G., Ashton B. Evolution and prevention of resistance.—*Nature*, 1964, v. 203, p. 1323—1330.
- Shalom A., Brock S. D. Effect of streptomycin and neomycin on physical properties of the ribosome.—*J. Molec. Biol.*, 1967, v. 24, p. 391—404.
- Shaw W. V. The enzymatic acetylation of chloramphenicol by extracts of R-xactor-resistant *Escherichia coli*.—*J. Biol. Chem.*, 1967, v. 242, p. 687—693.
- Shimizu M., Saito T., Mitsuhashi S. Macrolide resistance in *Staphylococcus aureus*. Induction of macrolide resistance by erythromycin and its derivatives.—*Japan. J. Microbiol.*, 1971, v. 15, p. 198—200.
- Shimizu T., Fukuyasu T., Terukado N. Effect of macarbomycin on transfer of R. factors among *E. coli* strains in gnotobiotic pigs.—*Nat. Inst. Anim. Health. Quart.*, 1972, v. 12, p. 230—231.
- Smekal E., Nezval J., Tabor H. Влияние атербина на антибактериальную активность неомицина по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*.—*«Журн. гиг. эпидемиол.»* (Прага), 1966, № 3, с. 323—330.
- Smith C. G. Differential interaction of nogalomycin with DNA varying base composition.—*USA*, 1965, v. 54, p. 566—572.
- Smith D. H. e. a. Resistance, factor-mediated spectinomycin resistance, factor-mediated spectinomycin resistance.—*Infect. Immunol.*, 1970, v. 1, p. 120—127.
- Smith H. W. Thermosensitive transfer factors in chloramphenicol-resistant strain of *Salmonella typhimurium*.—*Lancet*, 1974, N 7875, p. 281—290.
- Smith J. The effect of mitomycin C on DNA and m-RNA in *E. coli*.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1966, v. 114, p. 254—263.
- Smith W. Observations on the in vivo transfer of R-factors.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, v. 182, p. 80—90.
- Sobell H. M. e. a. Stereochemistry of actinomycin DNA binding.—*Nature New Biol.*, 1971, v. 231, p. 200—205.
- Sompolinsky D., Ben-Yakov M., Aboud M. Transferable resistance factors with mutator effect in *Salmonella typhi*.—*Mutat. Res.*, 1967, v. 4, p. 119—127.
- Sompolinsky D., Ziegler-Schlomowitz R., Herzog D. Inactivation of chloramphenicol by gram-negative microorganisms.—*Canad. J. Microbiol.*, 1968, v. 14, p. 891—902.
- Sompolinsky D., Samra Z. Mechanism of high-level resistance to chloramphenicol in different *Escherichia coli* variants.—*J. Gen. Microbiol.*, 1968b, v. 50, p. 55—66.

- Sonstein S. A., Baldwin J. N. Loss of the penicillin plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate.—"J. Bact.", 1972, v. 109, p. 262—265.
- Stachelin T., Neselson H. Determination of streptomycin sensitivity by a subunit of the 30S ribosome of *E. coli*—"J. Molec. Biol.", 1966, v. 19, p. 207—210.
- Stenzel W. Untersuchungen über die Hybridisierung zwischen *E. coli* und *Shigella* in vivo.—"Arch. Hyg. Bakt.", 1963, Bd. 147, S. 444—550.
- Stocker B. A. D., Zinder N. D., Lederberg J. Transduction of flagellar characters in *Salmonella*.—"J. Gen. Microbiol.", 1953, v. 9, p. 410—433.
- Stellwagen R. H., Cole R. D. Chromosomal proteins.—"Ann. Rev. Biochem.", 1969, v. 38, p. 951—990.
- Strominger J. L. e. a. How penicillin kills bacteria: progress and problems.—"Proc. Roy. Soc.", Lond. B, 1971, v. 179, p. 369—383.
- Sugino Y., Hirota Y. Conjugal fertility associated with resistance factor R in *Escherichia coli*—"J. Bact.", 1962, v. 84, p. 902—910.
- Suzuki Y., Okamoto S. The enzymatic acetylation of chloramphenicol by the multiple drug-resistant *Escherichia coli* carrying R-factor.—"J. Biol. Chem.", 1967, v. 242, p. 4722—4730.
- Szilagui J. F., Pennington T. H. Effect of rifamycins and related antibiotics on the DNA-dependent ribonucleic acid polymerase of vaccinia virus particulates.—"J. Virol.", 1971, v. 8, p. 133—141.
- Tabor H. The stabilization of *Bac. subtilis* transforming principle by spermine.—"Biochem. Biophys. Res. Commun.", 1961, v. 4, p. 228—331.
- Tabor H. The protective effect of spermine and other polyamines against heat denaturation of deoxyribonucleic acid.—"Biochemistry", 1962, v. 1, p. 496—501.
- Tabor H., Tabor W. Spermidine, spermine, and related amines.—"Pharmacol. Rev.", 1964, v. 6, p. 245—300.
- Takagi Y. e. a. Synthesis of 3'-deoxykanamycin B.—"J. Antibiot.", 1973, v. 26, p. 403—406.
- Takahashi I., Gibbons N. Genetic transformation of *Bac. subtilis* by extracellular DNA.—"Biochim. Biophys. Res. Commun.", 1962, v. 7, p. 467—472.
- Takasawa S. e. a. Studies on adenylylstreptomycin, a product of streptomycin inactivation by *E. coli* carrying the R-factor.—"J. Antibiot.", 1968, v. 21, p. 477—484.
- Tanaka N., Kawano G., Kikoshita T. Chromosomal location of a fusidic acid resistant marker in *Escherichia coli*.—"Biochim., Biophys. Res. Commun.", 1971, v. 42, p. 564—567.
- Tanaka N., Sashikata K., Umezawa H. Antibiotic sensitivity of ribosomes from kanamycin-resistant *E. coli*.—"J. Antibiot.", 1967, v. 120, p. 115—119.
- Tanaka S. A study of some factors connected with the transformation in vivo.—"Jap. J. Bact.", 1958, v. 13, p. 132—137.
- Tatum E., Lederberg J. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*.—"J. Bact.", 1947, v. 53, p. 673—682.
- Thomas C. A., Berns K. I. The Physical characterisation of DNA molecules released from T2 and T4 bacteriophage.—"J. Molec. Biol.", 1961, v. 3, p. 277—288.
- Thomas R. Recherches sur la cinétique des transformations bactériennes.—"Biochim. Biophys. Acta", 1955, t. 18, p. 467—475.
- Tomoeda M. e. a. Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate.—"J. Bact.", 1968, v. 95, p. 1078—1089.
- Treffers H. P., Spinelli V., Belser N. O. A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*.—"Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1954, v. 40, p. 1064—1071.

- Tsukamura M., Hashimoto M. Transformation of isoniazid and streptomycin resistance in *Mycobacterium avium* by the DNA.—"Am. Rev. Resp. Dis.", 1960, v. 81, p. 403—415.
- Tunneval G. Laboratory and clinical studies with erythromycin.—"J. Am. Pharm. Ass.", 1954, v. 48, p. 673—683.
- Umezawa H. e. a. Isolation and structure of kanamycin inactivated by a cellfree system of kanamycin-resistant *E. coli*.—"J. Antibiot.", 1967a, v. 20, p. 136—141.
- Umezawa H. e. a. Phosphorilative inactivation of aminoglycosidic antibiotics by *Escherichia coli* carrying R-factor.—"Science", 1967b, v. 157, p. 1559—1561.
- Umezawa H. e. a. Adenylylstreptomycin a product of streptomycin inactivated by *Escherichia coli* carrying R-factor.—"J. Antibiot.", 1968, v. 21, p. 81—82.
- Umezawa H. e. a. 3',4'-Dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.—"J. Antibiot.", 1971, v. 24, p. 485—487.
- Umezawa H. e. a. Studies on amino sugara. XXIX. The synthesis of 3'-O-methylkanamycin.—"Bull. Chem. Soc. Japan.", 1972, v. 45, p. 2842—2847.
- Voll M., Goodgal S. Recombination during transformation in *Hemophilus influenzae*.—"Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1961, v. 47, p. 505—612.
- Wacker A. The transfer of sensitivity to streptomycin among *E. coli*.—"Arzneim.-Forsch.", 1960, Bd. 10, S. 488—492.
- Walton J. The public health implications of drug-resistant bacteria in farm animals.—"Ann. N. Y. Acad. Sci.", 1971, v. 182, p. 358—361.
- Watanabe T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria.—"Bact. Rev.", 1963, v. 27, p. 87—115.
- Watanabe T. The origin of R-factors.—"Ann. N. Y. Sci.", 1971, v. 182, p. 126—140.
- Watanabe T., Fukasawa T. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. II. Elimination of resistance factors with acridine dyes.—"J. Bact.", 1961a, v. 81, p. 679—686.
- Watanabe T., Fukasawa T. Episomic resistance factors in Enterobacteriaceae. XII. Chromosomal attachment of resistance transfer factor in *Escherichia coli* strain K-12.—"Med. Biol.", 1961b, 59, p. 180—184.
- Watanabe T. e. a. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. VII. Two types of naturally occurring R-factors.—"J. Bact.", 1964, v. 88, p. 716—726.
- Watanabe T. Transferable drug resistance: the nature of the problem.—In: Bacterial episomes and plasmids. London, 1969, p. 81—101.
- Watanabe T. e. a. Fish culturin and R-factors.—In: Bacterial plasmids and antibiotic resistance. Prague—New York, 1972, a, p. 131—142.
- Watanabe T., Furuse C. Drug-resistant transductions of *Salmonella typhimurium* obtained by transduction of an R-factor.—"Japan. J. Gen.", 1966a, v. 41, p. 487—488.
- Watanabe T., Ogata C. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IX. Recombination of an R-factor with F.—"J. Bact.", 1966b, v. 91, p. 43—50.
- Watanabe T., Ogata Y. High-frequency transduction of tetracycline resistance marker of R-factor by phage P22 in *Salm. typhimurium*.—In: Bacterial plasmids and antibiotic resistance. Prague—New York, 1972b, p. 191—202.
- Weaber J. R., Pattee P. A. Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*.—"J. Bact.", 1964, v. 88, p. 574—580.
- Well A., Binder M. Experimental type transformation of *Shigella dysenteriae* (Flexner).—"Proc. Soc. Exp. Biol. Med.", 1947, v. 66, p. 349—358.
- Weinstein B. e. a. Miracil D effects on nucleic acid synthesis, protein synthesis and enzyme induction in *E. coli*.—"Biochim. Biophys. Acta", 1967, v. 142, p. 440—449.

- Weinstein B., Hirschberg E. Mode of action of miracil D — "Progr. in Molec. a. Subcell. Biol.", 1971, p. 136—139.
- Weisblum B. e. a. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: requirements for induction. — "J. Bact.", 1971, v. 106, p. 835—845.
- Weiser R., Asscher A., Wimpenny I. In vitro removal of antibiotic resistance by EDTA. — "Nature", 1968, v. 219, p. 1365—1377.
- Weiser R., Wimpenny I., Asscher A. Synergistic effect of EDTA/antibiotic combination on *Pseud. aeruginosa*. — "Lancet", 1969, v. 11, p. 619—723.
- Wells R. D. The binding of actinomycin D to DNA. — In: Progress in Molecular and Subcellular Biology", 1971, p. 240—248.
- Widemann B. Resistance transfer in vivo and its inhibition. — In: Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance. Prague — New York, 1972, p. 75—90.
- Woldringh C. L., Interson W. Effects of treatment with sodium dodecyl sulfate on the ultrastructure of *E. coli*. — "J. Bact.", 1972, v. 111, p. 801—813.
- Wood W. B., Berg P. Influence of DNA secondary structure on DNA — dependent polypeptide synthesis. — "J. Molec. Biol.", 1964, v. 9, p. 452—471.
- Yaginuma S. e. a. Biochemical properties of a cephalosporin betalactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. — "Japan. J. Microbiol.", 1973, v. 17, p. 141—149.
- Yamada T., Tipper D., Davies J. Enzymatic inactivation of streptomycin by R factor-resistant *Escherichia coli*. — "Nature", 1968, v. 219, p. 288—291.
- Yokota K., Akiba T. Studies on the mechanism of transfer of drug-resistance in bacteria, VII. Inhibition of transfer of the resistance factor from *E. coli* to *Shigella flecneri* by some chemicals. — "Med. Biol.", 1961, v. 58, p. 188—191.
- Yokota T., Akiba T. Studies on the mechanism of transfer of drug-resistance in bacteria. 19. Biochemical aspects on ³⁵S-sulfathiazol incorporated into cells of the drug sensitive strain and the multiple resistant strain of *Escherichia coli*. — "Med. Biol.", 1962, v. 63, p. 160—164.
- Yoshikawa M. Drug sensitivity and mutability to drug resistance associated with the presence of the R-factor. — "Genet. Res.", 1971a, v. 17, p. 1—7.
- Yoshikawa M. Selective enrichment of R-segregants as the main mechanism of "curing" of the R-factor by acridine dyes. — "Genet. Res.", 1971b, v. 17, p. 8—16.
- Yoshikawa M., Sevag M. Sensitivity of *E. coli* to atabrine conferred by R-factor and its potential clinical significance. — "J. Bact.", 1967, v. 93, p. 245—253.
- Yoshikawa M., Okuyama A., Tanaka N. A third kasugamycin resistance locus KsgC affecting ribosomal protein S, in *Escherichia coli* K-12. — "J. Bact.", 1975, v. 122, p. 796—797.
- Zinder N., Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. — "J. Bact.", 1952, v. 64, p. 670—699.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
<i>Глава I. Современные представления об эпидемиологии и механизмах лекарственной устойчивости микроорганизмов</i>	<i>7</i>
Изменение белоксинтезирующего аппарата клетки и синтеза нуклеиновых кислот	19
Изменение клеточной стенки и цитоплазматических мембран	21
<i>Глава II. Применение ДНК-тропных соединений для преодоления устойчивости к антибиотикам</i>	<i>39</i>
<i>Глава III. Межбактериальная передача резистентности к антибиотикам и ее подавление</i>	<i>61</i>
Передача устойчивости к антибиотикам при генетической трансформации и действие некоторых препаратов на этот процесс	61
Передача устойчивости к антибиотикам при конъюгации и действие некоторых препаратов на этот процесс	82
Передача устойчивости к антибиотикам при трансдукции и действие некоторых препаратов на этот процесс	95
<i>Глава IV. Поиск путей преодоления лекарственной устойчивости на основе представления о ее механизмах</i>	<i>103</i>
Применение мембранотропных и поверхностно-активных веществ для преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам	103
Повышение чувствительности к антибиотикам белоксинтезирующей системы бактерий как один из возможных путей преодоления устойчивости	112
Подавление ферментов, инактивирующих антибиотики, — один из путей преодоления резистентности бактерий к антибиотикам	115
<i>Глава V. Предупреждение и преодоление резистентности бактерий к антибиотикам в клинической практике</i>	<i>124</i>
Литература	161

ИБ №

ИГОРЬ

Редакт
Худож
Переп
Техни
Корре

Слан
Печ.
Цена

Лени

Лени
вста
Лени

ИБ № 411

ИГОРЬ МИХАЙЛОВИЧ ТЕРЕШИН

**ПРЕОДОЛЕНИЕ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Редактор М. С. ПОЛЯК
Художественный редактор А. И. ПРИЙМАК
Переплет художника Л. М. КОЛОМЕЙЦЕВОЙ
Технический редактор Т. И. БУГРОВА
Корректор А. Ф. ЛУКИЧЕВА

Сдано в набор 29/III 1977 г. Подписано к печати 11/VII 1977 г. Формат бумаги 60×90¹/₁₆.
Печ. л. 11,5. Бум. л. 5,75. Учетно-изд. л. 13,2. ЛН-72. Тираж 7000 экз. М-16908. Заказ 873.
Цена 1 р. 40 к. Бумага типогр. № 2.

Ленинград, Медицина, Ленинградское отделение, 192104, Ленинград, ул. Некрасова д. 10.
Ленинградская типография № 4 Союзполиграфпрома при Государственном комитете Со-
вета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 196126,
Ленинград, Ф-126, Социалистическая ул., 14.

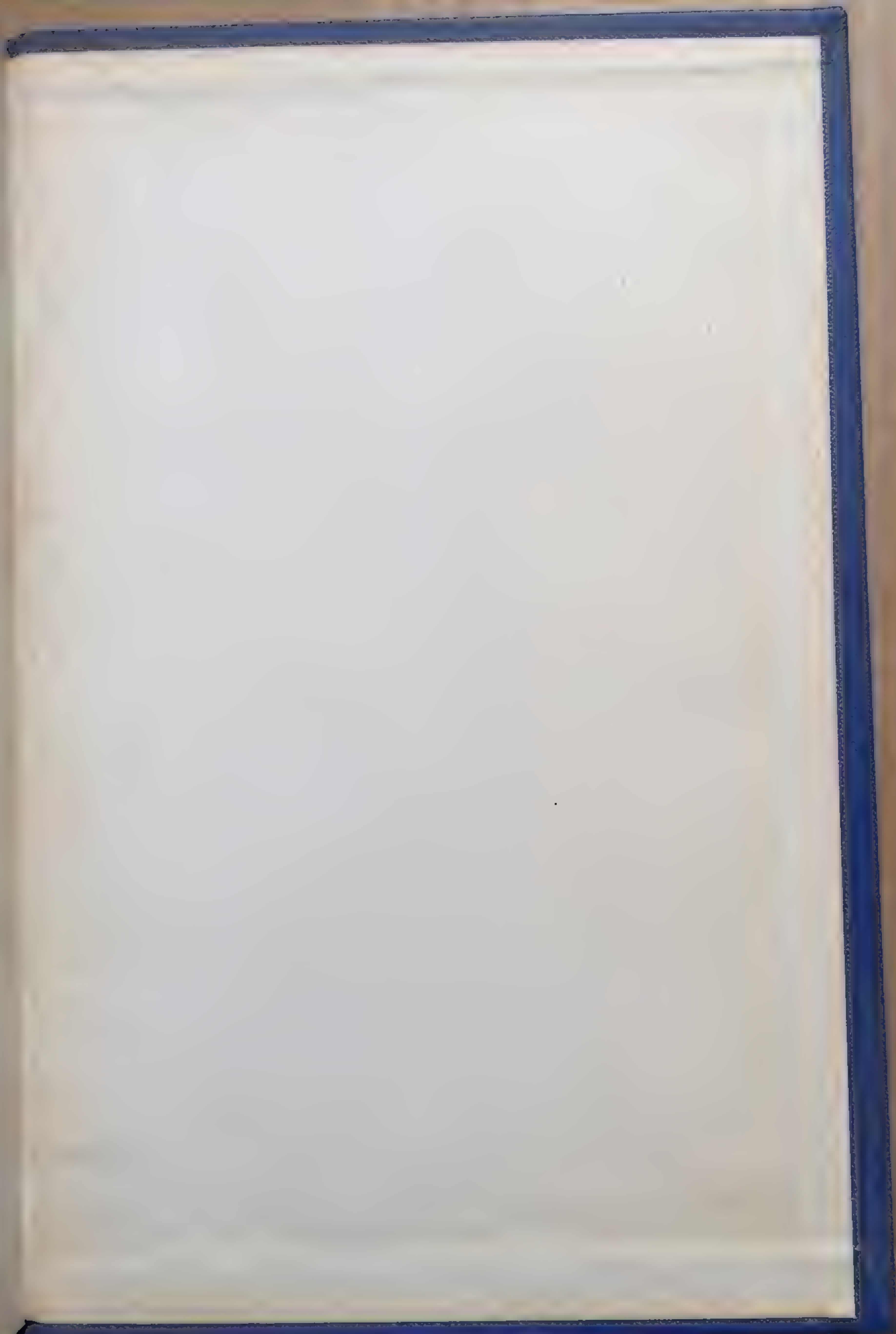
*ГОТОВИТСЯ К ИЗДАНИЮ
В 1977 ГОДУ*

Дунаевский О. А. Дифференциальная диагностика желтух. Л., «Медицина», 15 л.

В книге освещаются вопросы дифференциальной диагностики острого и хронического вирусных гепатитов с новообразованиями (печени, желчного пузыря, желчных путей и поджелудочной железы), холециститами, доброкачественными гипербилирубинемиями, гемолитическими желтухами и некоторыми инфекционными заболеваниями, которые могут сопровождаться желтухами.

Дана оценка значения анамнестических, клинических, лабораторных, рентгенологических и различных инструментальных методов обследования больных при дифференциальной диагностике этих заболеваний.

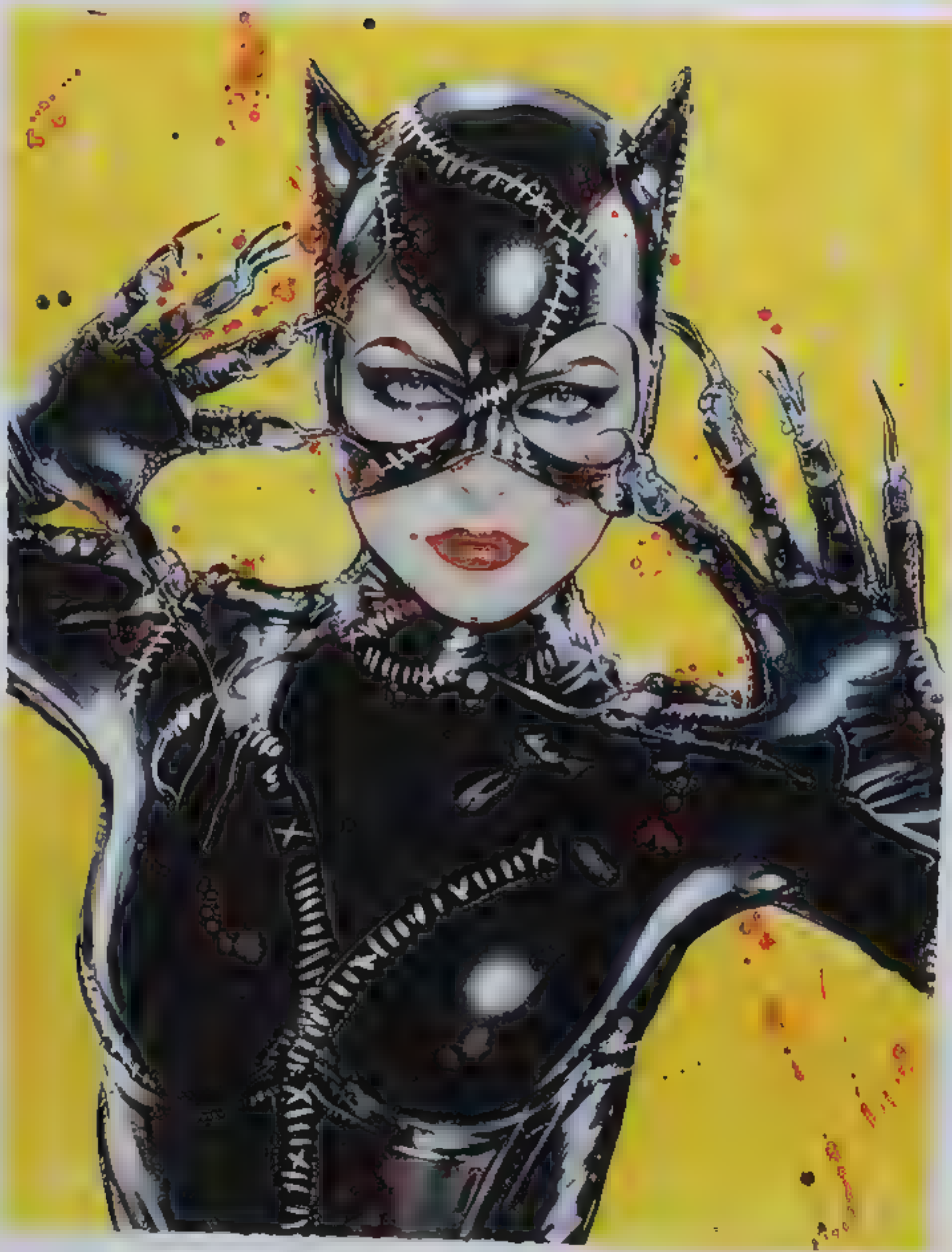
Книга издается в серии «Библиотека практического врача». Издание рассчитано на инфекционистов.













THE DEADWOOD HEAD

THUR

10 PM EST / 9 PM CST

AMC

















**ВСЕГДА
не верьте
тому что
кажется,
верьте
ТОЛЬКО
доказательствам.**



Чарльз Диккенс. «Большие надежды» 1861 г.